



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

**INSUFICIENCIA HEPÁTICA AGUDA INDUCIDA Y
TRASPLANTE ALOGÉNICO DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO.
MODELO EXPERIMENTAL EN RATA.**

— TESIS DOCTORAL —

JAVIER SALINAS GÓMEZ

MADRID, 2016

Doña **ISABEL PASCUAL MIGUELÁÑEZ**, Doctora en Medicina, Don **MARIANO GARCÍA ARRANZ**, Doctor en Biología y Don **DAMIÁN GARCÍA OLMO**, Catedrático de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, **declaran:**

QUE el trabajo **“INSUFICIENCIA HEPÁTICA AGUDA INDUCIDA Y TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO. MODELO EXPERIMENTAL EN RATA.”**, presentado por el Licenciado en Medicina D. JAVIER SALINAS GÓMEZ para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo su dirección y tutela.

QUE representa un meritorio esfuerzo para indagar sobre el posible uso de la terapia celular en la insuficiencia hepática aguda.

QUE ha sido realizado con objetivos claramente establecidos, metodología científica adecuada y rigor en la evaluación de los resultados obtenidos, así como con claridad expositiva.

QUE se trata de una aportación de valor científico indudable y que reúne todos los requisitos para ser defendida ante el Tribunal correspondiente.

Lo que hacemos constar en Madrid, a 17 de junio de 2016.

Los directores, Dra. I. Pascual Migueláñez Dr. M. García Arranz

El tutor, Prof. Dr. D. García Olmo

Conflicto de intereses

Este estudio ha sido realizado en el Laboratorio de Terapia Celular (Área de Cirugía Experimental) del Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPaz) con ayudas de la Fundación para la Investigación Médica Mutua Madrileña.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación ha sido, sin duda, un gran reto personal; un reto, porque la investigación seria es lenta, metódica, rigurosa, frustrante en muchas ocasiones y sus resultados, siempre fruto del trabajo en equipo.

Y personal, porque supone para mí la posibilidad de acceder al mundo académico, por el cual siento un profundo respeto, además de un sentimiento de deuda por tanto recibido, y verdadera vocación por contribuir a su desarrollo, ya sea desde el ámbito docente o desde la investigación .

El esfuerzo necesario para lograr realizar el presente trabajo, ha sido posible sólo gracias al apoyo prestado por muchas personas, a las cuales quiero recordar y mostrar infinita gratitud en estas primeras líneas.

En primer lugar, gracias a Isabel, por aceptarme como su primer doctorando, creer en mí (a veces más que yo mismo), estar y ser accesible en todo momento, apoyarme siempre y enseñarme cómo lo difícil puede hacerse fácil. Su visión pragmática a la vez que rigurosa del trabajo ha sido fundamental.

En segundo lugar, gracias a Damián, por alentar siempre en mí el espíritu investigador y el valor del esfuerzo.

Gracias a Mariano, por sus continuos ánimos y sus imprescindibles consejos sobre la correcta metodología para este trabajo.

Gracias a Luz, Susana y Rocío, por su infinita paciencia conmigo y sus incontables e impagables horas de trabajo.

Gracias al personal encargado del animalario, desde veterinarios a celadores, por su disponibilidad y entrega absolutas.

Gracias a la Dra. Madero, del Servicio de Bioestadística del Hospital Universitario La Paz, por su inestimable colaboración.

Gracias a Alberto, mi mentor quirúrgico y gran apoyo personal. Gracias por “mimarme” y hacerme crecer como cirujano y persona. Para ti mi cariño y gratitud siempre.

Gracias a mis compañeros, especialmente a los de la Sección de Cirugía Hepato-Bilio-Pancreática, por enseñarme y transmitirme sus conocimientos de esta rama tan apasionante y difícil de la Cirugía, y por las horas robadas a la asistencia, que sin duda les debo, para las fugas al laboratorio y el tiempo necesitado para escribir este trabajo.

Gracias a mis pacientes, porque cada día me animan a ser mejor y me recuerdan que elegí la profesión más bella del mundo (y la más dura a veces).

Quiero dar las gracias también a mi familia. A mis padres, Pilar y Francisco, porque a ellos y a sus sacrificios desde julio de 1983 debo el ser lo que soy ahora, y a mi tía Amalia, “tita”, por su continua contribución a mi formación y su inmenso cariño.

Por último, sólo me quedan palabras para mi mujer, Carmen. Gracias por ser mi mejor amiga y compañera, por soportar mi cansancio después de tantas guardias y horas de trabajo, a pesar del tuyo propio; por decirme siempre lo que necesitaba oír y no lo que quería, por cuidarme y estar siempre a mi lado, especialmente en los malos momentos. Estás presente en cada página de esta tesis.



“La voluntad al servicio de una idea”

— Santiago Ramón y Cajal —

ÍNDICE

Conflicto de intereses	7
Agradecimientos	11
Índice de abreviaturas y acrónimos	19
1. Justificación	25
2. Introducción	29
2.1. Insuficiencia hepática aguda	31
2.1.1. De la definición al tratamiento	31
» Definiciones y clasificación	31
» Epidemiología y etiología	32
» Fisiopatología, clínica y diagnóstico	35
» Complicaciones	41
» Pronóstico	42
» Tratamiento	44
2.1.2. Técnicas y dispositivos de asistencia hepática	49
» Dispositivos artificiales	49
» Dispositivos bioartificiales	53
» Trasplante hepático auxiliar	55
2.1.3. Trasplante ortotópico hepático	56
2.2. Terapia celular	59
2.2.1. Células madre mesenquimales derivadas de adipocitos	61
2.2.2. Terapia celular e insuficiencia hepática aguda	65
» Trasplante de hepatocitos maduros	66
» Trasplante de hepatocitos fetales o hepatoblastos	69
» Trasplante de células madre adultas de origen hepático	70
- Células progenitoras hepáticas o células ovaes	70
» Trasplante de células madre de origen no hepático	73

ÍNDICE

- Células madre mesenquimales derivadas de médula ósea y tejido adiposo (BMSCs y ASCs)	73
- Células madre pluripotenciales inducidas (iPS)	76
» Otras fuentes celulares	78
- Células madre embrionarias	78
- Hepatocitos xenogénicos	78
2.3. Modelos experimentales de insuficiencia hepática aguda	80
2.3.1. Modelos quirúrgicos	80
» Hepatectomía total o parcial	80
» Desvascularización completa o transitoria	83
2.3.2. Modelos farmacológicos hepatotóxicos	85
» Paracetamol	85
» Tetracloruro de carbono	87
» Galactosamina	92
» Tioacetamida	93
2.3.3. Modelos infectivos	94
» Víricos	94
» Bacterianos	95
3. Hipótesis de trabajo y objetivos	99
3.1. Hipótesis de trabajo	101
» Hipótesis conceptual	101
» Hipótesis nula	101
» Hipótesis operativa	101
» Hipótesis estadística	102
3.2. Objetivos	102
» Objetivo del proyecto	102
» Objetivo principal	102
» Objetivo secundario	103
3.3. Relevancia del proyecto	103

3.4. Limitaciones del estudio	104
4. Material y métodos	107
4.1. Animales, técnicas y material utilizados	109
» Animales	109
» Obtención y cultivo de ASCs	110
» Caracterización de las ASCs	112
» Inyección intraperitoneal de CCl ₄	112
» Anestesia	113
» Extracción de sangre	113
» Inyección intravenosa de ASCs	114
» Sacrificio	115
» Histología e inmunohistoquímica	115
4.2. Diseño experimental	120
4.2.1. Estudio de dosis	121
4.2.2. Estudio de inducción de IHA con CCl ₄ y tratamiento con ASCs	123
4.2.3. Estudio de la ruta celular y evaluación cuantitativa del número de ASCs	125
4.3. Método estadístico	128
4.3.1. Estudio de dosis	128
4.3.2. Estudio de inducción de IHA con CCl ₄ y tratamiento con ASCs	128
5. Resultados	131
5.1. Estudio de dosis	133
5.1.1. Análisis bioquímico	133
5.1.2. Análisis histopatológico	143
5.1.3. Mortalidad	145
5.2. Estudio de inducción de IHA con CCl ₄ y tratamiento con ASCs	150
5.2.1. Análisis bioquímico	150
5.2.2. Análisis histopatológico	158

ÍNDICE

5.2.3. Mortalidad	162
5.3. Estudio de la ruta celular y evaluación cuantitativa del número de ASCs	164
6. Discusión	187
6.1. Relevancia clínica del estudio	189
6.2. Idoneidad del modelo experimental	191
6.3. Análisis y discusión de resultados de la terapia celular	201
7. Conclusiones	213
8. Resumen	217
9. Bibliografía	223
10. Índice de tablas, figuras, y gráficos	255
11. Anexos	263

Índice de abreviaturas y acrónimos

AASLD	American Association for the Study of Liver Diseases
AFP	Alfa-fetoproteína
ALT	Alanina aminotransferasa
ALFED	Acute Liver Failure Early Dynamic
AoCLF	Acute o Chronic Liver Failure
APOLD	Auxiliary partial orthotopic liver transplantation
ASCs	Adipose tissue derived Mesenchymal Stem Cells
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosín trifosfato
BAL	Bioartificial Liver
BMSCs	Bone Marrow derived Mesenchymal Stem Cells
B _T	Bilirrubina total
CCl ₃ ·	Radical triclorometilo
CCl ₃ OO·	Radical triclorometilperóxido
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
céls	células
CK	Citoqueratina
CMV	Citomegalovirus
COX	Ciclooxygenasa
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro
DILI	Drug-induced liver injury
DNEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxiribonucleic acid
dsDNA	Double stranded desoxiribonucleic acid
EBV	Epstein Barr Virus
ECD	Extended Criteria Donors
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein

EH	Encefalopatía hepática
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
FA	Fosfatasa alcalina
FGF	Fibroblast Growth Factor
FMO	Fracaso multiorgánico
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GAL	Galactosil α -(1,3)-galactosil β -1,4- <i>N</i> -acetyl glucosaminil
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GGT	Gamma-glutamyl transpeptidasa
GSH	Glutación
HALT	Heterotopic auxiliary liver transplantation
HASC	Células madre hepáticas adultas
HBPM	Heparina de bajo peso molecular
HELLP	Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIC	Hipertensión intracraneal
HLC	Célula Hepatocyte-like
HLC-iPS	Célula Hepatocyte-like derivada células madre pluripotenciales inducidas
HPC	Células hepáticas progenitoras
HSC	Hematopoietic Stem Cells
HT	Hipotermia terapéutica
IgG	Inmunoglobulina de clase G
IgM	Inmunoglobulina de clase M
IHA	Insuficiencia hepática aguda
IL	Interleuquina
INR	International Normalized Ratio
iPS	Célula madre pluripotencial inducida
IRA	Insuficiencia renal aguda
JNK	C-jun-N-terminal Kinase
KCC	King's College Criteria

Lac ⁻	Lactato
LH	Luteinizing Hormone
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MARS	Molecular Adsorbent Recirculating System
MHC	Major Histocompatibility Complex
MHV-A59	Murine hepatitis virus A59
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
miRNA	Microácido ribonucleico
MSCs	Mesenchymal Stem Cells
NAPQI	N-acetil- <i>p</i> -benzoquinonimina
NF-κB	Nuclear factor kappa-light chain enhancer of activated B cells
NH ₃	Amonio
NK	Natural Killer
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONT	Organización Nacional de Trasplantes
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno 1
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PERV	Porcine endogenous retrovirus
PIC	Presión intracraneal
PTFE-e	Politetrafluoroetileno expandido
RCT	Randomized Control Trial
RHDV	Rabbit hemorrhagic disease virus
ROS	Reactive Oxygen Species
RVP	Resistencias vasculares periféricas
SD	Sprague-Dawley
SEPET	Selective Plasma Filtration Therapy
Sig.	Significación estadística
SIRS	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
SPAD	Single-Pass Albumin Dialysis
TAM	Tensión arterial media

TIPS	Transyugular Intrahepatic Portosystemic Shunt
TH	Trasplante hepático
TCH	Trasplante de células hepáticas maduras
TNF	Tumor necrosis factor
TOH	Trasplante ortotópico hepático
TP	Tiempo de protrombina
TRALI	Transfusion Related Acute Lung Injury
TTPa	Tiempo de tromboplastina parcial activado
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UDP	Uridina difosfato
UNOS	United Network for Organ Sharing
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHA	Virus de la hepatitis A
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VHD	Virus de la hepatitis D
VHE	Virus de la hepatitis E
VHS	Virus herpes simplex
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VVZ	Virus varicela-zóster
WGALT	Whole graft auxiliary liver transplantation

1. JUSTIFICACIÓN

“Status questionis”

1. JUSTIFICACIÓN

La insuficiencia hepática aguda (IHA) es un síndrome clínico complejo, derivado de un daño hepático severo y repentino, a nivel celular, capaz de alterar de forma transitoria o permanente, las funciones metabólicas y de detoxificación propias del hígado.

Las principales características clínicas que lo definen son, la encefalopatía hepática, la hipotensión, la coagulopatía y la insuficiencia renal aguda, siendo frecuente la aparición de edema cerebral e hipertensión intracraneal, infecciones y, en etapas más evolucionadas, fracaso multiorgánico (FMO).

A pesar de que la incidencia anual es baja y se estima en 1 – 6 casos por millón de habitantes¹, el pronóstico es pobre y la mortalidad elevada — por encima del 85% en series históricas —. Actualmente la supervivencia global se sitúa en torno al 65%², merced a los avances en los cuidados intensivos de las últimas décadas, pero sobre todo, a la introducción del trasplante hepático (TH) en la práctica clínica.

El trasplante hepático ha logrado cambiar el pronóstico de esta entidad, alcanzando supervivencias superiores al 80%, frente al 35% de supervivencia espontánea cuando sólo se utilizan medidas de soporte³, y sigue siendo en la actualidad, el único tratamiento eficaz de la enfermedad hepática terminal.

Por desgracia, el TH es un recurso limitado por la escasez de donantes. Por ello, por la alta letalidad de la IHA, por su mayor incidencia en jóvenes y por la falta de terapias alternativas eficaces, es necesario continuar profundizando en el estudio de su fisiopatología y desarrollar nuevas líneas de investigación que nos permitan tratar con seguridad y eficacia a estos pacientes.

En este sentido, múltiples tratamientos y dispositivos han sido desarrollados en los últimos años con el propósito y la finalidad de suplir la función hepática en espera de una *restitutio ad integrum* del órgano dañado^{4,5,6,7} o de conseguir, al menos, ganar tiempo sirviendo como puente al trasplante.

Encuadrada dentro de estas líneas noveles de investigación se encuentra la terapia celular con células madre, cuyos efectos sobre la modulación de la respuesta inflamatoria en diversas patologías son conocidos^{8,9,10,11}. Hasta la fecha, existen

1. JUSTIFICACIÓN

pocos estudios — la mayoría de ellos experimentales —, de tratamiento de la IHA con células madre¹².

Nuestro grupo de investigación tiene una sólida experiencia investigadora en este campo, especialmente con el uso de células madre mesenquimales derivadas de adipocitos (ASCs)^{13,14,15,16,17,18,19,20}, — en anastomosis intestinales y traqueales con suturas recubiertas con ASCs, fístulas traqueobronquiales, tratamiento de fístulas anales complejas y rectovaginales en la enfermedad de Crohn y fugas de aneurismas de aorta abdominal tratadas con endoprótesis vascular —, por lo que decidimos estudiar sus efectos en la insuficiencia hepática aguda, empezando por un modelo experimental ya desarrollado de IHA inducida por toxicidad tras la administración de tetracloruro de carbono (CCl₄).

En este trabajo, se presentan los resultados de la optimización de dicho modelo en nuestro laboratorio y de los efectos producidos por la administración de ASCs.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. INSUFICIENCIA HEPÁTICA AGUDA

2.1.1. De la definición al tratamiento

Definiciones y clasificación

La IHA, según la primera definición moderna propuesta por Trey y Davidson en 1970²¹, consiste en una disfunción hepática grave, potencialmente reversible, asociada al desarrollo de encefalopatía en las 8 semanas siguientes al inicio de los síntomas (ictericia) y en ausencia de enfermedad hepática previa conocida.

Desde entonces, más de 40 definiciones²² de IHA han sido publicadas con la finalidad de clasificar a los pacientes en subgrupos clínicamente relevantes; las más ampliamente aceptadas y divulgadas son las propuestas por O'Grady et al.²³, Bernau et al.²⁴ y Mochida et al.²⁵, en las que varía el intervalo de tiempo desde el inicio de la ictericia hasta la aparición de la encefalopatía, manifestación clínica central en la IHA por su valor pronóstico (figura 1).

En la actualidad, sin embargo, para evitar la enorme ambigüedad del término se tiende a utilizar la definición propuesta por la “American Association for the Study of Liver Diseases” (AASLD) en la última actualización de sus recomendaciones de 2011: evidencia de coagulopatía con “International Normalized Ratio” (INR) $\geq 1,5$ y cualquier grado de alteración del estado mental (encefalopatía) en un paciente sin cirrosis previa y con sospecha de afección hepática de menos de 26 semanas de duración². De esta manera, se abandonan los términos hiperagudo, agudo y subagudo propuestos en la anterior definición de la AASLD, ya que en realidad no tienen un valor pronóstico diferente del de la causa de la IHA².

La ausencia de enfermedad hepática previa es un criterio fundamental, ya que existe el denominado *fallo hepático agudo sobre crónico* (del inglés *acute-on-chronic liver failure*, AoCLF), en el que subyace la descompensación de una cirrosis hepática preestablecida y que tiene un comportamiento clínico y pronóstico diferente^{26,27,28}.

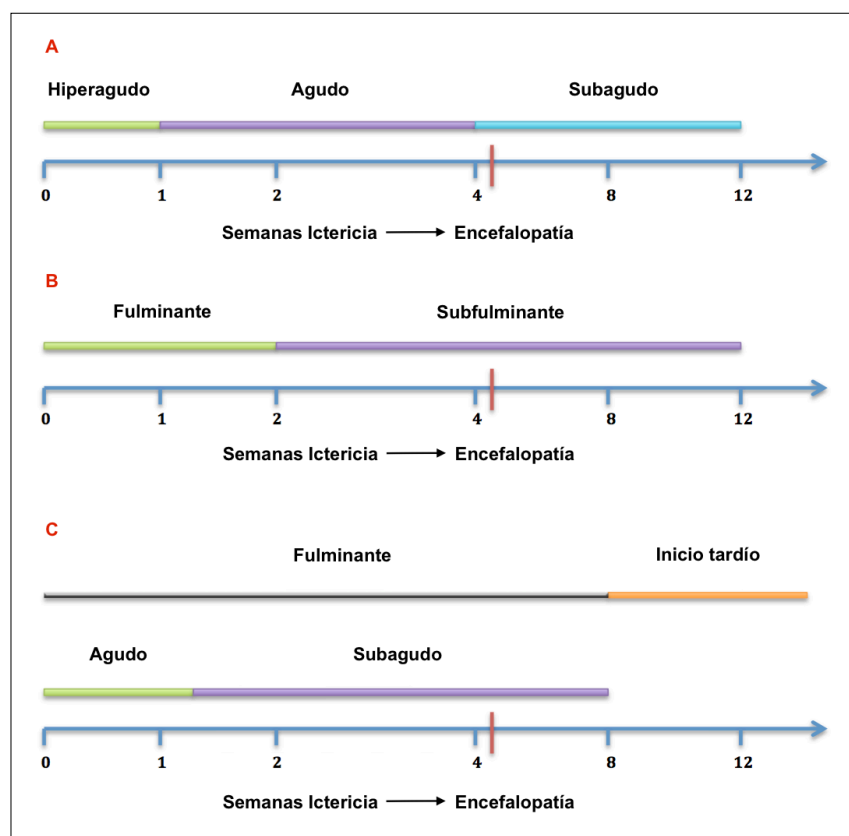


Figura 1. Clasificaciones de la IHA. A: O'Grady et al.; B: Bernau et al.; C: Mochida et al. Modificado de Bernal et al., 2013²⁹.

Epidemiología y etiología

La etiología de la IHA es muy variada (tabla 1), siendo la causa más frecuente a nivel mundial las hepatitis virales, especialmente, en países en vías de desarrollo y países de la cuenca mediterránea — incluida España (figura 2) —, mientras que en los países occidentales desarrollados, como EE.UU. y gran parte de Europa Occidental, predomina la IHA inducida por medicamentos, entre los que destaca la sobredosis por paracetamol (acetaminofén)^{30,31}.

Viral

La infección aguda por VHB es la causa más importante de IHA dentro de la etiología viral, aunque ésta puede ocurrir también tras la reactivación del virus en portadores crónicos³¹. Esta circunstancia, así como la coinfección por el VHD revisten un peor pronóstico. Su incidencia ha disminuido drásticamente en países

2. INTRODUCCIÓN

industrializados gracias a los programas de vacunación y a la eficacia de los tratamientos antivirales, pero sigue siendo la causa principal de IHA en países en desarrollo. En España, el VHB representa una tercera parte (28%) de los casos de IHA³².

El VHA es la segunda causa de IHA viral después del VHB y, al igual que el anterior, su incidencia ha disminuido merced a la vacuna administrada en la infancia en países desarrollados (< 5%)²⁹. El VHE, por el contrario, es una causa importante de IHA en países en los que el virus es endémico²⁹ y es especialmente agresivo en mujeres embarazadas³³. Además, la incidencia de IHA por el VHE en países occidentales está aumentando como consecuencia de infecciones zoonóticas³⁴.

El papel del VHC como agente causal es controvertido y la mayoría de los casos publicados provienen de poblaciones asiáticas. Otros virus como VHS-1, 2 y 6, VVZ, EBV, CMV y Parvovirus B19 han sido descritos como causa de IHA en casos aislados, la mayoría de ellos en estudios de pacientes en edad infantil o trasplantados con tratamiento inmunosupresor^{35,36,37,38,39,40,41}.

Paracetamol

El consumo de paracetamol, incluso a dosis terapéuticas, constituye la principal causa de IHA en EE.UU. (46%) y buena parte de Europa Occidental, siendo anecdótico en otros lugares, como España.

El paracetamol es un fármaco metabolizado en el hígado, donde se conjuga con ácido glucurónico (55%), ácido sulfúrico (30%) y cisteína (5%) para ser excretado renalmente. Sin embargo, aproximadamente un 5% de la dosis es metabolizado por enzimas del complejo citocromo P-450, produciendo N-acetil-*p*-benzoquinonimina (NAPQI), un metabolito altamente hepatotóxico que en condiciones normales es conjugado con glutatión (GSH) y otros grupos sulfhidrilos para su detoxificación⁴². El consumo concomitante de otras sustancias, entre las cuales destaca el alcohol, capaces de inducir la acción del citocromo P-450, junto a la presencia de ciertas comorbilidades o ciertos polimorfismos genéticos, constituyen factores de riesgo que aumentan la probabilidad de desarrollar IHA

2. INTRODUCCIÓN

tras la ingesta de paracetamol. Sin embargo, la principal causa de intoxicación por paracetamol es el intento autolítico.

Grupo	Causa
Toxicidad aguda (dosis-dependiente)	Paracetamol <i>Amanita (phalloides, phalloides var. alba, porrinensis, verna, virosa)</i>
Toxicidad idiosincrásica	Isoniazida, Rifampicina, Sulfasalazina, Fenitoína, Ác. Valproico, Carbamazepina, Metildopa, Estatinas, Efavirenz, Abacavir, Ciprofloxacino, Doxiclina, Itraconazol, Ketoconazol, Amoxicilina-Clavulánico, Trimetoprim-Sulfametoxazol, Amiodarona, Labetalol, Diclofenaco, Alopurinol, Ác. Nicotínico, Isoflurano,
Hepatitis víricas	VHA, VHB, VHC, VHD, VHE VHS 1 Y 2, VVZ EBV, CMV, Parvovirus B19
Inmunológicas	Hepatitis autoinmune Enfermedad injerto contra huésped
Metabólicas	Enfermedad de Wilson Déficit de α -1 antitripsina
Relacionadas con el embarazo	Hígado graso asociado al embarazo Síndrome de HELLP
Vasculares	Síndrome de Budd-Chiari Isquemia/Shock Enfermedad Venoclusiva
Infiltración tumoral maligna masiva	Metástasis (mama, pulmón) Leucemia Linfoma

Tabla 1. Causas conocidas de IHA. Modificado de Canbay et al., 2011³.

Idiopática

La IHA idiopática o de origen desconocido, sigue siendo muy frecuente en nuestro medio. Así, en España se calcula que alrededor de un 32,2% de los casos de IHA son de causa desconocida³². En gran medida, esto es debido a la imposibilidad de obtener una anamnesis directa del paciente por la alteración del estado mental secundaria al fallo hepático.

2. INTRODUCCIÓN

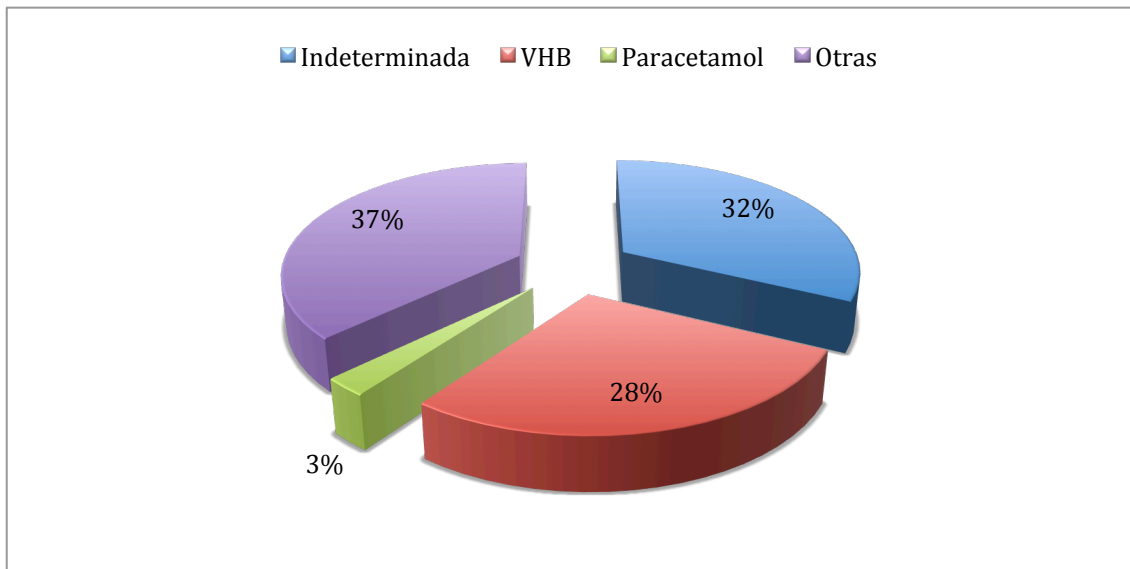


Figura 2. Causas de IHA en España.

Fisiopatología, clínica y diagnóstico

La IHA se caracteriza, independientemente de la causa inicial, por la pérdida aguda de la función hepatocelular y por el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y el fracaso multiorgánico ² secundarios a la muerte masiva y descontrolada de hepatocitos, como consecuencia de un daño hepatocelular grave.

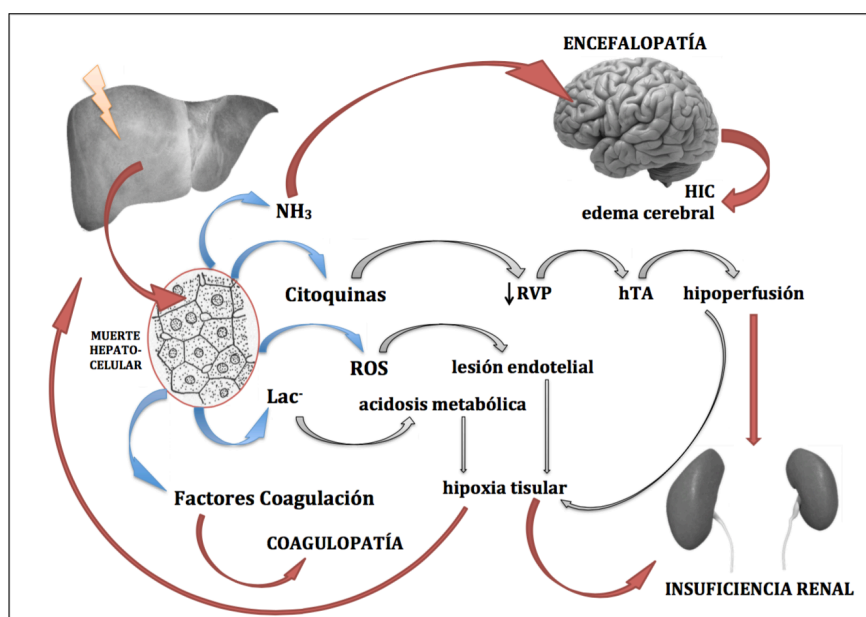


Figura 3. Fisiopatología de la IHA. Esquema.

2. INTRODUCCIÓN

Las alteraciones orgánicas y metabólicas, tras la agresión primitiva, conducen al establecimiento de un círculo vicioso con desarrollo de daño hepático secundario, como se observa en la figura 3 y que perpetúa el cuadro clínico.

Alteraciones hemodinámicas

El SIRS desencadenado por la endotoxemia provoca la disminución de las resistencias vasculares periféricas (RVP) — alteración hemodinámica clave en la fisiopatología de la IHA —. La hipotensión resultante, mantenida en el tiempo y sin un control adecuado, conduce a la hipoperfusión orgánica e hipoxia tisular, contribuyendo al desarrollo del fracaso orgánico, especialmente renal⁴³.

Insuficiencia renal aguda

La insuficiencia renal aguda (IRA) es otra manifestación clínica fundamental en la IHA, ya que ocurre entre el 50% y el 80% de los casos^{3,29}. Sus causas principales son la necrosis tubular aguda, secundaria a toxicidad directa — IHA por paracetamol — o a lesión por isquemia-reperfusión, y más frecuentemente, funcional, por hipoperfusión secundaria a las alteraciones hemodinámicas, de características muy similares al síndrome hepatorenal en pacientes cirróticos^{44,45}.

Diferenciar entre ambas causas es difícil, ya que en la IRA funcional, la actividad tubular se mantiene sólo hasta que la hipoperfusión renal provoca necrosis tubular, momento a partir del cual son clínica e histológicamente indistinguibles.

La aparición de IRA en pacientes con IHA empeora notablemente el pronóstico, aumentando la mortalidad y favoreciendo el desarrollo de otras complicaciones, como el aumento del riesgo de infección o de hemorragia secundario a la uremia^{44,45,46,47,48}.

Encefalopatía hepática

El aumento en sangre periférica de los niveles de amonio (NH_3) da lugar a una de las manifestaciones clínicas más importantes de la IHA, la encefalopatía hepática.

2. INTRODUCCIÓN

Se trata de un trastorno neuropsiquiátrico producido por el acúmulo de esta sustancia en el tejido cerebral y cuyo espectro varía, desde un leve cuadro confusional, hasta el coma⁴⁹ (tabla 2).

Sin embargo, aunque la hiperamoniemia está directamente relacionada con el desarrollo de EH — como lo demuestran los trastornos innatos del metabolismo del amonio —, en el contexto de la IHA, los niveles de NH_3 no se correlacionan con la gravedad de los síntomas ni con el pronóstico, poniendo de manifiesto que existen otros factores que contribuyen a su desarrollo, como la inflamación o la infección^{49,50}.

Estadio	Clínica	Asterixis	EEG
I	Euforia, depresión, desorientación leve, alteraciones del sueño, dificultad para hablar	+/-	Ondas Trifásicas
II	Letargia, desorientación moderada	+	Ondas Trifásicas
III	Gran desorientación, habla incoherente, somnoliento pero despertable con la voz	+	Ondas Trifásicas
IV	Comatoso, respuesta sólo inicialmente al dolor, postura de descerebración o decorticación	-	Actividad Delta

Tabla 2. Clasificación de la encefalopatía hepática (criterios de West Haven).

La homeostasis del amonio es un proceso multiorgánico complejo, en el que el hígado tiene un papel central; el amonio generado a partir del nitrógeno de la dieta (glutamina) es absorbido libremente a través del epitelio intestinal, llegando a la circulación portal y al hígado, donde en condiciones normales, el exceso es retirado eficazmente del torrente sanguíneo a través del ciclo de la urea (excreción renal) y de la glutamina sintetasa⁵⁰. El fallo hepático y la IRA frecuentemente asociada impiden su detoxificación, aumentando su concentración plasmática.

El exceso de amonio en sangre resulta un potente inhibidor del metabolismo y la función de los astrocitos, por lo que el tejido cerebral produce mayores cantidades

2. INTRODUCCIÓN

de glutamina a través de la glutamina sintetasa existente en la glía astrocitaria en un intento de reducir este exceso; pero, la glutamina acumulada en exceso en el interior de los astrocitos, también ejerce un efecto deletéreo sobre la función cerebral, debido a su toxicidad mitocondrial y a su comportamiento como osmolito orgánico en el citosol, que provocan la edematización de los astrocitos, contribuyendo así al desarrollo de dos de las principales y más letales complicaciones de la IHA, el edema cerebral y la hipertensión intracraneal (HIC)^{50,51}.

Coagulopatía

La importancia de las alteraciones de la coagulación en la IHA ha variado mucho a lo largo del tiempo y clásicamente se han tratado de corregir de forma intensiva. Sin embargo, a la luz de estudios más recientes, éstas parecen no correlacionarse con el verdadero riesgo de hemorragia espontánea, ya que el número de eventos hemorrágicos recogidos, en general, son escasos^{52,53} y además de poca gravedad — grado ≤ 1 de la escala de hemorragia de la OMS⁵⁴ —. Esto es debido a dos hechos:

1. Las pruebas clásicas de coagulación — tiempo de protrombina (TP), INR, tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) — miden con poca precisión el tiempo hasta la formación del primer coágulo y su alteración tiene un escaso valor pronóstico de hemorragia en pacientes con IHA⁵⁵. Otras técnicas de laboratorio más novedosas, como la tromboelastografía, permiten medir la coagulación de una forma más global, analizando parámetros más importantes como la firmeza del coágulo.
2. A pesar de la disminución generalizada de la síntesis de los factores de la coagulación — cuyo principal productor es el hígado — y de la disminución del recuento plaquetario, existen mecanismos de compensación que permiten que la función de la hemostasia esté preservada^{55,56}, de entre los que destacan: el aumento de la contribución de las plaquetas a la firmeza del coágulo, el aumento de los factores VIII, von Willebrand y factor tisular — secundario a la activación endotelial —, el aumento del factor inhibidor del activador del

2. INTRODUCCIÓN

plasminógeno-1 (PAI-1) y una gran disminución de los niveles de proteínas anticoagulantes, como la proteína C y S, entre otros^{53,56,57}.

Alteraciones metabólicas

Las alteraciones metabólicas y del equilibrio ácido-base en la IHA son frecuentes, con fluctuaciones de los niveles de glucosa y disminución de los niveles plasmáticos de fosfato, magnesio y potasio, así como la aparición tanto de acidosis como de alcalosis. En realidad, cualquier alteración es posible y además, variable a lo largo del tiempo conforme a la evolución de la enfermedad, especialmente cuando la IHA se acompaña de fracaso renal^{44,58}.

Diagnóstico

Desde el punto de vista diagnóstico, a cualquier paciente con sospecha clínica o analítica de IHA debe realizársele un estudio de coagulación para medición del tiempo de protrombina (TP); si éste está aumentado en 4 segundos o más — lo que equivale a un INR $\geq 1,5$ — y existe evidencia de alteración del sensorio, el paciente debe ser ingresado con diagnóstico de IHA.

Inicialmente los síntomas pueden ser de carácter muy inespecífico, como anorexia, fatiga, dolor abdominal o fiebre; la ictericia puede estar tanto presente como ausente, no siendo por ello de gran valor al inicio del cuadro, pero la presencia de encefalopatía, dada la rápida progresión del cuadro, debe ser un signo de alerta y el paciente debe ser ingresado en una Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y contactar con un centro de TH, por si es necesario su traslado. Éste ha de efectuarse lo antes posible, cuando el paciente presenta EH grado I o II, ya que estadios más avanzados de EH pueden evolucionar al coma irreversible y contraindicar formalmente el TH.

La anamnesis debe ser exhaustiva, estableciendo el tiempo de evolución de los síntomas y el posible consumo de sustancias tóxicas o exposición a virus y debe descartarse la existencia de una enfermedad hepática preexistente.

2. INTRODUCCIÓN

Dentro de las pruebas complementarias, los exámenes de laboratorio son esenciales; éstos permiten realizar una evaluación aproximada de la gravedad del cuadro, valorando la función hepática y la de otros órganos potencialmente afectados, así como establecer la posible causa. En la tabla 3 se recogen los parámetros analíticos que deben analizarse de forma rutinaria en todo paciente con sospecha de IHA.

Tiempo de Protrombina/INR

Bioquímica: Na⁺, K⁺, Cl⁻, HCO₃⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, PO₄³⁻, Glucosa, AST, ALT, FA, GGT, B_T, Albúmina, Creatinina, BUN

Gasometría arterial

Lactato arterial

Hemograma completo

Pruebas cruzadas: Grupo, Rh y Anticuerpos

Niveles de Paracetamol

Panel de tóxicos

Serología vírica hepática: IgM anti-VHA, HBsAg, IgM anti-HBc, anti-VHE, anti-VHC, RNA VHC*, IgM VHS-1, VVZ

Niveles de Ceruloplasmina**

Test de embarazo

Amonio arterial

Maracadores autoinmunes: ANAs, ASMA, Inmunoglobulinas

VIH-1 y 2***

Amilasa y Lipasa

Tabla 3. Parámetros de laboratorio a analizar inicialmente en la IHA.

*Para detectar infección latente/**Solo si se sospecha enfermedad de Wilson/**Por su implicación en el TH. Modificado de Lee et al., 2011².

La biopsia hepática, sin embargo, no es necesaria de forma rutinaria para establecer el diagnóstico, salvo en los raros casos en los que se sospeche una infiltración maligna del hígado⁵⁹ o en los que la sospecha clínica sea difícil de establecer — en algunas series de IHA la correlación entre la histología y la sospecha clínica es pobre —.

La ecografía Doppler es otra herramienta diagnóstica rápida, poco invasiva y muy útil, ya que permite medir el flujo portal y el de las venas hepáticas y descartar la

existencia de un cuadro de hipertensión portal secundario a una cirrosis previa o incluso, un síndrome de Budd-Chiari.

Complicaciones

Las complicaciones más importantes que pueden desarrollarse durante un cuadro de IHA — asumiendo que la encefalopatía, la insuficiencia renal, la coagulopatía y las alteraciones metabólicas forman parte del cuadro clínico en sí —, son principalmente tres: el edema cerebral, la hipertensión intracraneal y las infecciones.

Edema cerebral e hipertensión intracraneal

El edema cerebral y la hipertensión intracraneal, relacionadas de forma inherente, son las complicaciones más graves de la IHA⁶⁰. Aproximadamente dos terceras partes de los pacientes con IHA y encefalopatía grado III o IV sufren edema cerebral^{61,62} y es una de las principales causas de mortalidad de la IHA^{63,64,65,66}. La etiología es multifactorial, pero existe tanto un componente citotóxico — alteración del metabolismo y la capacidad de osmoregulación de la astrogliá por neurotoxicidad directa del NH_3 — como un componente vasogénico — alteración del mecanismo de autorregulación del flujo cerebral y pérdida de la integridad de las uniones fuertes celulares que componen la barrera hematoencefálica —, descrito por primera vez por Klatzo en 1967⁶⁷.

La herniación uncal ha sido clásicamente el desenlace más temido, pero hoy en día, gracias al aumento de la supervivencia de la IHA, se ha de prestar especial atención a la contribución del edema cerebral a la lesión de origen hipóxico-isquémico y a las secuelas neurológicas a largo plazo en los supervivientes⁶⁸.

Infección

El hígado es un componente esencial del sistema inmune. En la IHA, el rápido deterioro de la función inmunológica se traduce en un aumento del riesgo de

2. INTRODUCCIÓN

infección, tanto bacteriana como fúngica, con una incidencia cercana al 80% y al 32%, respectivamente y es, además, otra importante causa de mortalidad^{59,69,70,71,72}.

Los mecanismos descritos que favorecen el desarrollo de sepsis son la opsonización ineficaz debido la síntesis reducida de proteínas a nivel hepático — como la fibronectina —, la función deficitaria de las células de Kupffer, la disminución de la síntesis de las proteínas del sistema del complemento y la alteración en la función de los neutrófilos, entre otros^{73,74}.

En la actualidad, la administración profiláctica de antibióticos y antifúngicos sigue siendo controvertida ya que algunos estudios sugieren que no aumenta significativamente la supervivencia⁷⁵ y sí la tasa de resistencias, mientras que otros, dado que la mayoría de las infecciones se producen en las primeras 72h desde el ingreso y que las infecciones de origen fúngico son de difícil diagnóstico y alta mortalidad, abogan por el uso de un régimen antibiótico de amplio espectro desde el inicio y no demorar la adición de un antifúngico al tratamiento^{59,72}.

Clínicamente es importante conocer la relación existente entre la sepsis y el progreso de la encefalopatía hepática a estadios más avanzados⁷⁶, por lo que el deterioro del nivel de conciencia debe ser un signo de alarma ante una posible infección, al igual que un descenso inexplicado de la tensión arterial, una disminución de la diuresis, un empeoramiento de la acidosis o el desarrollo de coagulación intravascular diseminada (CID)⁷².

Pronóstico

Determinar el pronóstico, es decir, identificar de manera precisa a aquellos pacientes que se van a beneficiar de un TH urgente es crucial y, además, de una manera precoz. Por ello, es necesario desarrollar modelos predictivos fiables de supervivencia y necesidad de TH, ya que nos permitirán utilizar de una forma racional el uso de órganos escasos, evitando el TH en aquellos pacientes que puedan recuperarse espontáneamente y evitar la necesidad de inmunosupresión de por vida y la morbilidad asociada.

2. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existen muchos modelos para determinar el pronóstico, basados en grandes números de pacientes (tabla 4)³. Los modelos más utilizados en la actualidad son el “KCC” (*King’s College Hospital Criteria*) en Europa y el “MELD score” (*Model of End-Stage Liver Disease*; “PELD” en pacientes pediátricos) en EE.UU., sin embargo, aún hoy siguen sin tener la precisión deseada, como demuestra el hecho de que hasta el 35% de los pacientes en lista de espera para TH se recuperan espontáneamente antes de ser trasplantados y que hasta el 20% de pacientes con IHA se estima que son trasplantados innecesariamente².

Modelo	Factores Pronósticos	
KCC	Paracetamol	Considerar seriamente incluir en lista para TH: <ul style="list-style-type: none"> - lactato arterial > 3,5 mmol/L después de fluidoterapia precoz Incluir en lista para TH: <ul style="list-style-type: none"> - pH < 7,3 o lactato arterial > 3,0 mmol/L después de fluidoterapia adecuada - Si se cumplen los 3 criterios en 24h: <ul style="list-style-type: none"> o Encefalopatía hepática grado III o IV o INR > 6,5 o Creatinina > 3,4 mg/dL
	Otras causas	Incluir en lista para TH: <ul style="list-style-type: none"> - INR > 6,5 y encefalopatía presente (I-IV) o se cumplen 3 de 5 criterios: <ul style="list-style-type: none"> - edad < 10 años o > 40 años - Tiempo ictericia-encefalopatía > 7 días - INR > 3,5 - Bilirrubina ≥ 17 mg/dL - Etiología desfavorable: tóxica-medicamentosa idiosincrásica, enfermedad de Wilson, hepatitis seronegativa
Clichy	Encefalopatía hepática grado III o IV y: <ul style="list-style-type: none"> - factor V < 20% y edad < 30 años - factor V < 30% y edad > 30 años 	
MELD	$10 \times (0,957 \times \ln_{\text{creatinina sérica}} + 0,387 \times \ln_{\text{bilirrubina}} + 1,12 \times \ln_{\text{INR}} + 0,643)$	
CK-18/MELD	$10 \times (0,957 \times \ln_{\text{creatinina sérica}} + 0,387 \times \ln_{\text{CK-18/M65}} + 1,12 \times \ln_{\text{INR}} + 0,643)$	
BiLE	Bilirrubina (μmol/L)/100 + lactato (mmol/L): <ul style="list-style-type: none"> - + 4 (idiopática, Budd-Chiari, fenprocumon) - - 2 (acetaminofén) - ± 0 (otras etiologías) 	

Tabla 4. Modelos pronósticos en la IHA.

KCC, King’s College Criteria; MELD, Model of End-Stage Liver Disease;

CK-18, Citoqueratina 18; BiLE, Bilirubin-Lactate-Ethiology Score

Modificado de Canbay, A et al., 2011³.

2. INTRODUCCIÓN

Por ello, hoy en día se siguen realizando estudios para mejorar estos sistemas, introduciendo parámetros más novedosos, como el aclaramiento de verde de indocianina⁷⁷, la variación a lo largo del tiempo de los parámetros predictivos como variable (Acute Liver Failure Early Dynamic model, ALFED)⁷⁸, o marcadores moleculares como la citoqueratina-18⁷⁹.

Los factores más importantes que han demostrado tener un impacto sobre el pronóstico en el estudio multicéntrico más grande realizado hasta la fecha en EE.UU., son la etiología de la IHA y el grado de encefalopatía, aunque autores importantes, como O'Grady, sostienen además que el máximo grado alcanzado a lo largo del episodio es igualmente importante y que el desarrollo de IRA es también un factor pronóstico que debe ser tenido en cuenta⁵⁹. El INR, aunque no se correlaciona con el riesgo de hemorragia, sus variaciones a lo largo del tiempo también tienen un importante valor pronóstico⁵⁷.

Tratamiento

El tratamiento de la IHA se fundamenta en el soporte directo de la función hepática — mediante el tratamiento específico de la causa, si existe (antivirales en caso de infección por VHB, N-acetilcisteína en caso de intoxicación por paracetamol, etc.) y/o el uso de dispositivos de asistencia hepática o el trasplante hepático, en los casos más graves — y en el tratamiento de las complicaciones.

Los dispositivos de soporte hepático así como el trasplante hepático serán comentados más adelante. En cuanto al tratamiento de las complicaciones, en la mayoría de los casos, éste consiste en el uso de medidas generales no específicas, con la excepción de la encefalopatía hepática, que es característica de la insuficiencia hepática.

Así, las alteraciones hemodinámicas concretadas en un shock mixto (hipovolémico y distributivo) se tratan mediante reposición de volumen y uso de inotrópicos en caso refractario, con el objetivo terapéutico de mantener una tensión arterial media de 60 – 75 mmHg que garantice la perfusión de los órganos diana. No debe

2. INTRODUCCIÓN

olvidarse la posible insuficiencia suprarrenal asociada y el posible beneficio de la hidrocortisona. Sin embargo, como singularidad en la IHA, la mejoría hemodinámica observada en el momento de la explantación del hígado en el receptor durante un trasplante hepático ha llevado a considerar la resección hepática como posible tratamiento en estudios no controlados⁸⁰, pero sólo como último recurso cuando existe un órgano donado ya adjudicado y trasplantable en pocas horas.

La insuficiencia renal aguda, debida principalmente a la hipoperfusión renal como consecuencia de las alteraciones circulatorias, mejora con la normalización hemodinámica. A pesar de todo, la terapia de reemplazo renal — la forma continua es la más aceptada en la actualidad — suele ser necesaria de forma precoz, pero no existen datos suficientes para establecer esta práctica de forma sistemática^{81,82,83}.

El tratamiento de la encefalopatía hepática se centra principalmente en evitar o disminuir el edema cerebral y corregir la HIC. Clásicamente se ha realizado un abordaje multiestratégico, actuando sobre tres elementos clave⁷⁸: controlar los posibles factores precipitantes — hemorragia gastrointestinal, sepsis, hiponatremia, etc. —, reducir la absorción de amonio intestinal y disminuir sus niveles plasmáticos — disacáridos no absorbibles (lactulosa), antibióticos (rifamixina, neomicina), probióticos (*Lactobacillus*), detoxificantes del amonio (L-ornitina/L-aspartato [LOLA]), etc. — y actuar directamente sobre los mecanismos fisiológicos que conducen a la HIC (edema e hiperaflujo vascular cerebrales) — hiperventilación controlada, corticosteroides, agentes osmóticos (manitol, glicerol), hipernatremia (suero salino hipertónico), barbitúricos, etc. —

Por desgracia, este tratamiento se basa generalmente en estándares locales y opiniones personales y no está estandarizado⁸⁴. El objetivo terapéutico es mantener la PIC por debajo de 20 – 25 mmHg y una presión de perfusión cerebral de al menos 50 mmHg. Para ello, se recurre a la monitorización de la PIC mediante dispositivos invasivos, aunque su uso es controvertido dado el riesgo de complicaciones asociadas y a la ausencia de beneficio en algunos estudios^{85,86,87}. Actualmente puede utilizarse la ecografía Doppler transcraneal como método no invasivo o la espectroscopía transcraneal de infrarrojo cercano y la medición

2. INTRODUCCIÓN

ecográfica del diámetro de la vaina del nervio óptico, aunque éstas últimas son técnicas pendientes de validación clínica⁸⁸.

En 1950, Bigelow et al. demostraron en un estudio experimental que, la hipotermia en condiciones controladas, es capaz de disminuir el metabolismo y el consumo de oxígeno del organismo de forma paralela a la disminución de la temperatura corporal⁸⁹. Desde entonces se ha investigado mucho sobre el potencial de la hipotermia terapéutica en la práctica clínica; en el campo de la IHA, la primera serie de pacientes, tratados por Jalan et al.⁹⁰, data de 1999. Los efectos beneficiosos de la HT en la IHA se detallan en la tabla 5.

Sin embargo, a pesar de su eficacia en el control de la HIC en pacientes con encefalopatía hepática grados III y IV, hasta la fecha sólo se ha podido demostrar una mejoría marginal en menores de 25 años con IHA inducida por paracetamol y no disponemos de ningún estudio aleatorizado y controlado que demuestre un aumento de la supervivencia en ausencia de trasplante hepático, aunque sí permite ganar tiempo como terapia puente hasta la disponibilidad de un órgano^{7,91}. Por ello, y por la existencia de complicaciones como el aumento del riesgo de infecciones, su utilización debe ser todavía cauta.

En cuanto a las alteraciones de la coagulación, en la actualidad no se recomienda intentar corregir el INR sin evidencia de hemorragia activa y si no se va a realizar ningún procedimiento invasivo, ya que se enmascaran las variaciones del INR, que tienen un importante valor pronóstico, y porque la transfusión de plasma fresco congelado y plaquetas se asocia a mayor riesgo de lesión pulmonar en pacientes críticos⁹² — TRALI, del inglés “*transfusión related acute lung injury*” — y a un mayor riesgo de infección⁹³. La administración de factor VII recombinante activado es una alternativa segura⁹⁴.

Aunque en algunos estudios se apunta a que los fenómenos trombóticos son más frecuentes que los hemorrágicos⁵⁷, sigue debatiéndose la necesidad de usar HBPM para la profilaxis antitrombótica en pacientes con IHA, si bien es cierto que la tendencia a administrarla de forma precoz, debido a su perfil de seguridad, es cada vez mayor.

2. INTRODUCCIÓN

Las alteraciones metabólicas deben corregirse lo antes posible mediante un soporte nutricional personalizado, tratando tanto la hipoglucemia⁵⁸ como la hiperglucemia, ya que ésta se asocia a mayor riesgo de hipertensión intracraneal en pacientes con IHA⁹⁵, manteniendo la glucemia por debajo de 150 mg/dL y aportando ácidos grasos de cadena ramificada para evitar la malnutrición, que aunque mejora la encefalopatía, no influye en la mortalidad⁹⁶. A este respecto, la limitación del aporte de proteínas como método para evitar el aporte de nitrógeno en forma de amonio y así prevenir o tratar la EH no se recomienda de forma sistemática ya que puede ser incluso deletéreo⁹⁷. La vía de administración de las fórmulas nutricionales debe ser, como en cualquier otro enfermo crítico, enteral siempre que se pueda.

Órgano/Sistema	Efecto
Cerebro	Disminución de la concentración y captación de NH ₃ Mejoría del metabolismo de la glucosa Atenuación del estrés oxidativo y nitrosativo, del aumento de glutamato y lactato extracelular y de la inflamación de la glía Disminución del volumen sanguíneo cerebral Disminución de la presión hidrostática en los capilares cerebrales Normalización del mecanismo de autorregulación del flujo cerebral
Circulatorio	Disminución de los niveles de NH ₃ circulante Disminución de las sustancias pro-inflamatorias Mejoría de las alteraciones hemodinámicas
Hígado	Disminución de la congestión hemorrágica Disminución del infiltrado inflamatorio neutrofilico Disminución de la apoptosis celular Restauración del glucógeno y del glutatión
Riñón	Disminución de la producción de NH ₃ renal Diuresis “por frío”
Tubo digestivo	Disminución de la producción de NH ₃ intestinal

Tabla 5. Beneficios de la hipotermia terapéutica en la IHA. Modificado de Vaquero et al., 2012⁹⁸.

En la actualidad existe un ensayo multicéntrico en fase de reclutamiento, dirigido por William Lee, de la *University of Texas Southwestern Medical Center*, con registro NCT00518440 y título “*A Multi-Center Trial to Study Acute Liver Failure in Adults*”⁹⁹, que pretende seguir recogiendo datos clínicos, bioquímicos y genéticos

2. INTRODUCCIÓN

de pacientes con IHA. Existen además numerosos ensayos en marcha que continúan intentando validar determinadas estrategias terapéuticas, especialmente en relación a la EH y la HIC — como el uso de manitol u ornitina fenilacetato^{100,101} —, y pronósticas — como el uso del aclaramiento plasmático del verde de indocianina¹⁰² —, entre otros.

A parte de estas medidas generales, a lo largo de las últimas décadas se han desarrollado diferentes técnicas y dispositivos con la intención de suplir, al menos en parte, la función hepática mientras el hígado nativo se recupera o permitiendo ganar tiempo y hacer de puente hasta el TH, que sigue siendo, hoy por hoy, el único tratamiento que ha demostrado aumentar la supervivencia en aquellos casos de IHA en los que la recuperación espontánea no es posible.

2.1.2. Técnicas y dispositivos de asistencia hepática

Desde un punto de vista formal podemos clasificar las diferentes técnicas de soporte de la función hepática en extracorpóreas, que a su vez se clasifican en dispositivos artificiales (o no-biológicos) y dispositivos bioartificiales (o biológicos) e intracorpóreas, donde destacan el trasplante hepático auxiliar, el trasplante hepático ortotópico y la terapia celular. Ésta última, concretamente el uso de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, que constituye el objeto de análisis de este estudio, será comentada en un apartado propio.

Dispositivos artificiales

Los dispositivos no-biológicos se fundamentan en el principio de la diálisis para detoxificar la sangre de los pacientes con IHA, mediante el uso de membranas artificiales y adsorbentes.

En la IHA es necesario eliminar del torrente sanguíneo sustancias tóxicas tanto solubles como no solubles y que circulan fundamentalmente unidas a la albúmina. Por ello, los sistemas de diálisis con regeneración de la albúmina son los más estudiados y los que mejores resultados ofrecen en la IHA.

Los tres dispositivos basados en este mecanismo sobre los que se han realizado ensayos clínicos son: MARS® (Molecular Adsorbent Recirculating System, Gambro GmbH, Hechingen, Baden-Württemberg, Alemania) (figuras 4 y 5), Prometheus® (Fresenius Medical Care GmbH, Bad Homburg von der Höhe, Hesse, Alemania) y SPAD® (Single Pass Albumin Dialysis). Sin embargo, únicamente los dos primeros han sido puestos a prueba en ensayos clínicos controlados y aleatorizados y el tercero, SPAD® (Single Pass Albumin Dialysis), se encuentra actualmente en un ensayo comparativo frente a MARS® (Molecular Adsorbent Recirculating System, Gambro GmbH, Hechingen, Baden-Württemberg, Alemania), en fase de reclutamiento: NCT02310542, “*Comparison of Two Extracorporeal Liver Support System (With or Without Recirculation): MARS (Molecular Adsorbents Recirculating System) Versus SPAD (Single Pass Albumin Dialysis) in Severe Liver Failure*”¹⁰³.

2. INTRODUCCIÓN

De todos ellos, el sistema MARS® (Gambro GmbH, Hechingen, Baden-Württemberg, Alemania), introducido en la práctica clínica en 1993 y merced al excelente perfil de seguridad y a los beneficios que aporta, especialmente en relación a la encefalopatía hepática en los casos de IHA, es el más ampliamente comercializado y utilizado, y por tanto, del que más datos disponemos. Sus indicaciones se muestran en la tabla 6.

Causa
Insuficiencia hepática aguda
Descompensación aguda e insuficiencia hepática aguda sobre enfermedad hepática crónica
Ictericia progresiva
Encefalopatía hepática
Síndrome hepato-renal refractario a terlipresina
Prurito intratable en la colestasis
Intoxicación aguda o sobredosis de sustancias potencialmente unidas a albúmina
Postrasplante hepático
Injerto no funcionante
Disfunción crónica del injerto (rechazo crónico, recurrencia de la enfermedad, etc.)
Fallo hepático secundario o Fracaso multiorgánico

Tabla 6. Indicaciones de la terapia con MARS® (Gambro GmbH, Hechingen, Baden-Württemberg, Alemania). Modificado de Saliba et al., 2015¹⁰⁴.

En la tabla 7 se muestran algunos de los ensayos más importantes realizados hasta la fecha con terapia MARS® (Gambro GmbH, Hechingen, Baden-Württemberg, Alemania).

MARS	Año	Patología	Tipo de estudio	n
Heemann et al.¹⁰⁵	2002	AoCLF	RCT	24
Mitzner et al.¹⁰⁶	2003	AoCLF	RCT	13
Schmidt et al.¹⁰⁷	2003	AoCLF	RCT	13
Sen et al.¹⁰⁸	2004	AoCLF	RCT	18
El Banayosy et al.¹⁰⁹	2004	IHA	RCT	27
Hassanein et al.¹¹⁰	2007	AoCLF	RCT	70
Montejo et al.¹¹¹	2009	IHA	Casos-Controles	45

Tabla 7. Principales estudios controlados con terapia MARS® (Gambro GmbH, Hechingen, Baden-Württemberg, Alemania). RCT = ensayo clínico controlado y aleatorizado. n = número de pacientes. IHA = insuficiencia hepática aguda. AoCLF = fallo hepático agudo sobre crónico.

2. INTRODUCCIÓN

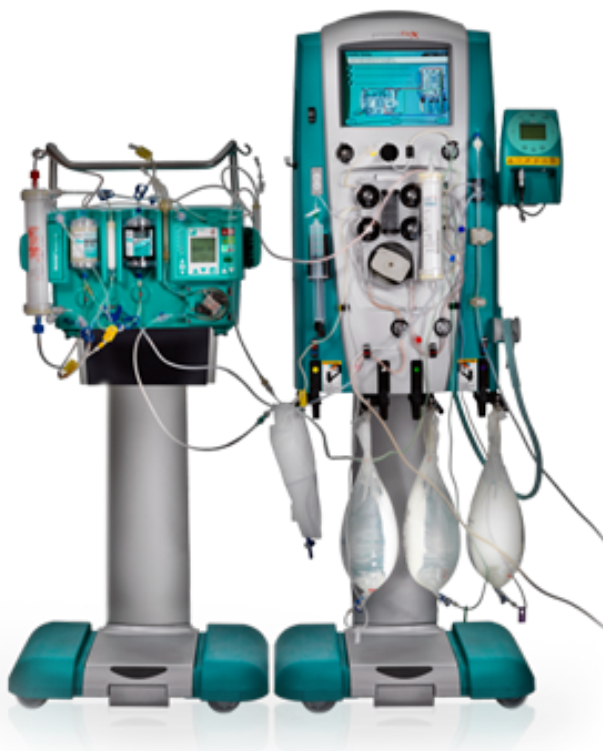


Figura 4. MARS® con Prismaflex® (Gambro GmbH, Hechingen, Baden-Württemberg, Alemania), con permiso de reproducción de Baxter S.L. (anexo 2).

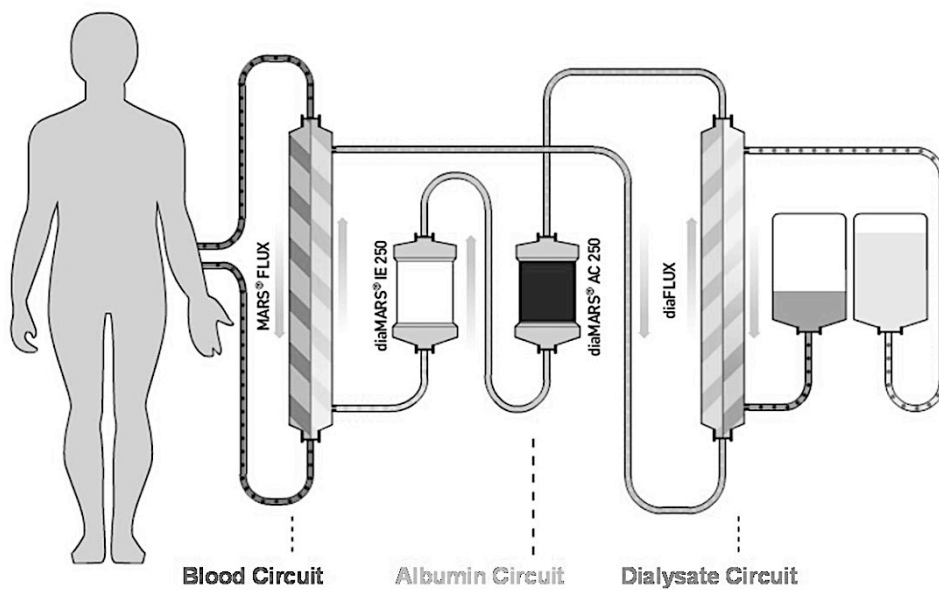


Figura 5. Esquema del funcionamiento de MARS® (Gambro GmbH, Hechingen, Baden-Württemberg, Alemania). Licencia de reproducción Creative Commons CC BY-SA 3.0 (anexo 3).

2. INTRODUCCIÓN

Lamentablemente, si hablamos de la supervivencia a largo plazo con el uso de estos dispositivos, tanto la revisión Cochrane de 2004¹¹² como metaanálisis posteriores concluyen que ésta está aún por demostrar^{113,114}. Únicamente el metaanálisis realizado en 2010 por Stutchfield et al.¹¹⁵, que incluye el ensayo clínico controlado y aleatorizado de Demetriou et al. de 2004¹¹⁶ — posterior a la publicación de la revisión Cochrane del mismo año —, concluye que sí existe un aumento de supervivencia estadísticamente significativo en los pacientes tratados con dispositivos bioartificiales frente a la terapia de soporte convencional en casos de IHA.

Los otros sistemas artificiales de soporte hepático basados en la diálisis de albúmina, incluido el más moderno Prometheus® (Fresenius Medical Care GmbH, Bad Homburg von der Höhe, Hesse, Alemania) que data de 1999¹¹⁷, tampoco han demostrado un aumento significativo de la supervivencia en pacientes con IHA¹¹⁸, y son inferiores a la terapia con MARS® (Gambro GmbH, Hechingen, Baden-Württemberg, Alemania) en términos clínicos y de coste-eficacia^{119,120}.

En la tabla 8 se describen los principales estudios realizados con Prometheus® (Fresenius Medical Care GmbH, Bad Homburg von der Höhe, Hesse, Alemania).

MARS vs PROMETHEUS	Año	Patología	Tipo de estudio	n
Krisper et al. ¹²¹	2005	AoCLF	RCT	10
Evenepoel et al. ¹²²	2006	AoCLF	Serie de casos	18
Stadlbauer et al. ¹²³	2006	AoCLF	RCT	8
Laleman et al. ¹¹⁹	2006	AoCLF	RCT	18
Faenza et al. ¹²⁴	2008	AoCLF	Serie de casos	57
Dethloff et al. ¹²⁵	2008	EHC	RCT	24

Tabla 8. Principales estudios comparativos de terapia MARS® (Gambro GmbH, Hechingen, Baden-Württemberg, Alemania) frente a Prometheus® (Fresenius Medical Care GmbH, Bad Homburg von der Höhe, Hesse, Alemania). RCT = ensayo clínico controlado y aleatorizado. n = número de pacientes. IHA = insuficiencia hepática aguda. AoCLF = fallo hepático agudo sobre crónico. EHC = enfermedad hepática crónica.

Tampoco en el tratamiento del AoCLF la terapia MARS® (Gambro GmbH, Hechingen, Baden-Württemberg, Alemania) ha conseguido resultados positivos en cuanto a supervivencia, según los últimos datos publicados en el estudio RELIEF, el más importante realizado sobre esta patología hasta la fecha¹²⁶.

2. INTRODUCCIÓN

Los principales sistemas de soporte hepático artificiales no basados en la diálisis de albúmina son el Liver Dialysis Device™ (HemoCleanse, Lafayette, Indiana, USA) — anteriormente llamado BioLogic-DT™ (HemoCleanse, Lafayette, Indiana, USA) y tercer dispositivo artificial con el que se han realizado ensayos clínicos controlados y aleatorizados —, de cuya utilidad no se puede extraer ninguna conclusión, ya que las únicas variables del estudio fueron la biocompatibilidad y la seguridad¹²⁷ y el Selective Plasma Filtration Therapy (SEPET), menos sofisticado que los anteriores y en el que, de hecho, parte de la albúmina del paciente se pierde debido al tamaño del poro de la membrana y ha de ser repuesta.

En la actualidad se continúan investigando, aunque a nivel aún preclínico, otros dispositivos de soporte hepático como el Li-ALS (Li's artificial liver system)¹²⁸, que combina el intercambio terapéutico de plasma a bajo volumen con la filtración y adsorción de plasma.

Dispositivos bioartificiales

Los dispositivos bioartificiales se caracterizan por el uso de células de estirpe hepática, bien de origen porcino, bien de origen humano, alojadas en el interior de un biorreactor conectado al circuito de diálisis. El uso de estos biorreactores otorga al sistema, además de la capacidad detoxificante propia de los sistemas artificiales, las capacidades metabólica, sintética y excretora propias del hígado.

Estos dispositivos, dado que se estima que la masa hepática mínima funcionante que un individuo puede tolerar es de aproximadamente el 20% del volumen total hepático y que se asume que no el 100% de las células del biorreactor serán normofuncionantes, contienen entre el 20% y el 30% de la masa hepática de un sujeto adulto normal¹²⁹.

Los hepatocitos maduros de origen humano son las mejores células desde el punto de vista teórico, ya que poseen las funciones necesarias para el soporte hepático. Sin embargo, su disponibilidad es limitada y su eficacia disminuye al ser cultivadas. Estos problemas han sido parcialmente solucionados cultivando las células hepáticas en una configuración 3D y de forma conjunta con células no

2. INTRODUCCIÓN

parenquimatosas, para estimular las interacciones célula-célula y la polaridad de los hepatocitos, pero han abierto también la posibilidad de incorporar otro tipo de células a los dispositivos¹³⁰.

Entre ellas, destacan los hepatocitos porcinos, que presentan la ventaja de una mejor criopreservación y facilidad de cultivo y cuya seguridad — se ha descartado la posibilidad de contaminación por el retrovirus endógeno porcino (PERV) — ha sido demostrada^{131,132}, y la línea C3A humana de células inmortalizadas de hepatoblastoma, autorizadas como medicamento huérfano en 2013 por la Comisión Europea (anexo 4) para su uso en la IHA por la compañía Vital Therapies (Vital Therapies Limited, Marlow, UK).

Otras líneas celulares en estudio para los biorreactores, aunque sin aplicabilidad clínica actualmente, son hepatocitos adultos o fetales inmortalizados y células madre de origen hepático, hematopoyético y mesenquimal¹²⁹.

En cuanto a resultados, los dispositivos bioartificiales utilizados en pacientes (tabla 9), han demostrado seguridad y mejorías significativas en parámetros clínicos, como una atenuación de la inestabilidad hemodinámica, reducción de la ictericia, de la encefalopatía hepática y de la presión intracraneal¹³³.

Dispositivo	Compañía	Tipo de célula
HepaMate™	HepaLife™ Technologies, Inc., Boston, Massachusetts, EE.UU.	Hepatocitos porcinos
ELAD® (Extracorporeal Liver Assist Device)	Vital Therapies, Inc., San Diego, California, EE.UU.	Células C3A inmortalizadas de hepatoblastoma humanas
AMC-BAL (Academic Medical Center-Bioartificial Liver)	HepArt Medical Devices B.V., Ámsterdam, Países Bajos	Hepatocitos porcinos
MELS® (Molecular Extracorporeal Liver Support)	Charité Universitätsmedizin, Campus Virchow-Klinikum, Berlín, Alemania	Hepatocitos humanos
BLSS (Bioartificial Liver Support System)	Excorp Medical, Inc., Minneapolis, Minnesota, EE.UU.	Hepatocitos porcinos
HBAL (Hybrid Bioartificial Liver)	TECA Corp., Hong Kong, China y Universidad de Nanjing	Hepatocitos porcinos

Tabla 9. Dispositivos bio-artificiales utilizados en pacientes con IHA.

2. INTRODUCCIÓN

Además, en algunos ensayos clínicos — siempre con la limitación del tamaño muestral y de que la mayoría son sobre AoCLF en vez de IHA —, han logrado aumentar el tiempo de supervivencia hasta alcanzar el objetivo del trasplante hepático, sirviendo así como “terapia puente”. Sin embargo, faltan datos concluyentes sobre su verdadera eficacia a largo plazo y como tratamiento definitivo que permita la recuperación y regeneración del hígado nativo, en ausencia de TH^{116,134}. Además, al compararlos con los dispositivos artificiales, no se encuentran diferencias de eficacia actualmente y sí en costes, siendo mucho más elevados en los biológicos¹³⁵.

Actualmente se están realizando estudios preclínicos con esferoides celulares, fundamentalmente porcinos, para el desarrollo de nuevos biorreactores¹³⁶. Los esferoides celulares son grupos de células que, bajo determinadas condiciones de cultivo, tienden a agregarse y formar estructuras primitivas del órgano de origen, adquiriendo una mayor funcionalidad que cuando se cultivan de forma clásica en monocapa^{137,138}.

Por último, respecto a la utilización de los dispositivos artificiales o bio-artificiales en España, resulta muy difícil validar su potencial como terapia sustitutiva o terapia puente al TH cuando la probabilidad de ser trasplantado en las primeras 24 horas desde el ingreso en lista de espera es muy elevado. En el trabajo publicado por Escorsell et al. en 2007, el 51,5% de los pacientes con IHA en España fueron trasplantados en las primeras 24 horas³².

Trasplante hepático auxiliar

El trasplante hepático auxiliar consiste en realizar el implante de un hígado completo o de una parte del mismo a un receptor en el que permanece su hígado nativo o, al menos, una parte de él. Existen tres tipos de trasplante auxiliar: trasplante hepático auxiliar heterotópico, trasplante hepático auxiliar parcial ortotópico y trasplante hepático auxiliar de injerto completo (HALT, APOLT y WGALT por sus siglas en inglés).

En casos seleccionados de IHA, especialmente en menores de 40 años y etiología vírica (VHA o VHB) o paracetamol, estas técnicas — con excepción del HALT — tienen buenos resultados a corto plazo y ofrecen una ventaja fundamental frente al TH estándar, que es la posibilidad de suspender de por vida la inmunosupresión en un alto porcentaje de pacientes, gracias a la recuperación del hígado nativo¹³⁹. Como desventaja, la técnica quirúrgica es más compleja y a largo plazo, existen mayores tasas de rechazo agudo, de complicaciones biliares y necesidad de retrasplante y, en algunos estudios, los resultados neurológicos a largo plazo no son buenos^{140,141}.

En el estudio realizado por Chenard-Neu et al. en el año 1996, la supervivencia a 18 meses fue del 63%, con una tasa de supresión de la inmunosupresión del 68% en los pacientes que sobrevivieron¹⁴². Más recientemente, en el estudio realizado por Quaglia et al. del King's College Hospital, con 49 pacientes entre 1994 y 2004 y publicado en 2008, la supervivencia fue del 77,6% y la tasa de retirada de la inmunosupresión del 52,6%⁶; en este estudio se describen además dos mecanismos diferentes de regeneración hepática, dependiente de la etiología: la proliferación hepatocelular en la IHA inducida por paracetamol y la expansión de células madre o progenitoras — además de la proliferación de los hepatocitos — en la IHA seronegativa. Y la serie de 24 pacientes con IHA secundaria a sobredosis por paracetamol de Rajput et al. en 2012, presenta una supervivencia actuarial a 5 años del 63% y una tasa de retirada de la inmunosupresión del 100%¹⁴³.

2.1.3. Trasplante ortotópico hepático

El trasplante hepático sigue siendo en la actualidad el único tratamiento capaz de aumentar la supervivencia de los pacientes con IHA de forma global². Desde su introducción para el tratamiento de la IHA, la supervivencia pos-trasplante al año en España es del 75,3%¹⁴⁴ (tabla 10), siendo del 63% en el King's College Hospital, para el mismo período de tiempo (1992 – 2000) y cercano al 80% en la actualidad¹⁴⁵.

2. INTRODUCCIÓN

Según datos del último Registro Español de Trasplante Hepático, desde 1984 hasta 2013, la IHA representa en nuestro país el 4,9% de las causas de TH, por detrás de la cirrosis (54,1%), del hepatocarcinoma (26,0%) y de la colestasis (8,4%). Durante esos 29 años de experiencia, se han registrado un total de 877 casos de IHA y 46 casos de fallo hepático subagudo, lo que representa una media de 31,8 casos al año¹⁴⁴.

De los 877 casos de TH por IHA registrados, 411 (46,86%) se han producido en el rango de edad de 16 a 39 años, aumentando hasta el 63,06% de las causas de TH si se incluyen todos los menores de 40 años, corroborando que la IHA es un trastorno que afecta de manera predominante a pacientes jóvenes.

Tiempo PT	1 mes	3 meses	1 año	3 años	5 años
Supervivencia	81,7%	77,6%	75,3%	72,4%	70,5%

Tabla 10. Supervivencia postrasplante en casos de IHA por todas las causas en España. Modificado del informe del Registro Español de Trasplante Hepático 2013¹⁴⁴.
Tiempo PT: tiempo transcurrido desde el trasplante hepático.

En relación con el TH, los pacientes con IHA pueden clasificarse en tres grupos³²:

1. aquéllos que no van a necesitar TH, por buen pronóstico y posibilidad de recuperación espontánea.
2. aquéllos que cumplen todos los criterios de elegibilidad para TH y:
 - a. son efectivamente trasplantados.
 - b. teniendo indicación de TH, desarrollan alguna complicación durante la espera en lista (fracaso multiorgánico, HIC incontrolable, etc.)
3. aquéllos que, teniendo necesidad de TH, presentan alguna contraindicación formal (edad avanzada, enfermedad neoplásica hepática, etc.).

La supervivencia a largo plazo en los pacientes que pertenecen al segundo grupo depende fundamentalmente de dos factores, de la urgencia del trasplante — la IHA es una de las pocas causas con status 1A de la UNOS o código 0 de la ONT — y de la calidad del injerto^{66,146}, sabiendo que, de entrada, el TH urgente tiene un peor

2. INTRODUCCIÓN

pronóstico que el TH no urgente, concentrándose la mayor parte de la mortalidad postrasplante en los primeros tres meses y como consecuencia de complicaciones neurológicas o sepsis².

La posibilidad de un TH urgente rápido depende de la disponibilidad de órganos y, pese a que España posee una de las mejores ratio de donantes por número de habitantes, es necesario aplicar “criterios extendidos de donante” (del inglés, Extended Criteria Donors, [ECD]) — que implica reducir la calidad apriorística del injerto, sin tener por ello que verse afectada la supervivencia postrasplante¹⁴⁷ — para aumentar el número de órganos. Sin embargo, cuando se atiende exclusivamente a la IHA como causa, la calidad del injerto sí tiene impacto en el pronóstico, como ya hemos comentado.

Otras posibilidades para expandir el pool de donantes son el “split” del injerto, el TH de donante vivo — realizado por primera vez en EE.UU. en 1997 y que aunque en la IHA supone tan sólo el 2% de los TH, ofrece una supervivencia al año del 75% —, el trasplante del donante en asistolia o el trasplante de injertos ABO incompatibles, que tiene peores resultados. Las principales críticas al trasplante de donante vivo son de aspecto ético — por la posibilidad de una evaluación incompleta o la posible coerción al donante — y la tasa de complicaciones en el donante, que llega hasta el 14,5% en algunas series¹⁴⁸.

Según las series publicadas, en nuestro país se han alcanzado tasas de TH en pacientes con IHA de hasta el 56%, que es muy elevada, gracias por un lado a la disponibilidad de órganos y, por otro lado, a la frecuencia casi anecdótica de la sobredosis por paracetamol como etiología — apenas el 2,6% de los casos^{32,149}—, que tiene per sé un mejor pronóstico, se asocia frecuentemente a trastornos psiquiátricos que contraindican el TH y tiene además un tratamiento específico y eficaz, la N-acetilcisteína^{150,151}.

2.2. TERAPIA CELULAR CON CÉLULAS MADRE

La terapia celular se define como el uso de células vivas para reparar, mantener o potenciar la función de un órgano o tejido. Dentro del concepto de terapia celular, por tanto, cabe el uso de muchos tipos de células, entre las cuales, se encuentran las células madre (*stem cell*).

Las células madre son aquellas células que poseen las siguientes características:

1. Autorrenovación: capacidad para dividirse por un período indefinido de tiempo, generando células idénticas.
2. Diferenciación: capacidad de madurar o “comprometerse” hasta adquirir la morfología y función o funciones de un tipo celular específico.
3. Flexibilidad o Plasticidad: capacidad de diferenciarse en diferentes líneas celulares.

La autorrenovación y la diferenciación son fenómenos que suceden tras la división celular, en un proceso denominado replicación o división asimétrica, en el que la célula madre es capaz de dar origen a una réplica celular exacta de sí misma y a otra célula con una función más especializada.

Según su potencialidad o capacidad de diferenciarse en otras líneas celulares, las células madre se clasifican en:

1. Totipotenciales: corresponden a las células madre más primitivas, capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario (placenta) y, por tanto, crear un organismo completo. Están presentes en el cigoto durante las tres primeras divisiones celulares, es decir, hasta la fase de mórula.
2. Pluripotenciales: son aquellas células capaces de diferenciarse en cualquier célula del organismo adulto, pero se diferencian de las totipotenciales en que no pueden formar un organismo completo ya que, a partir de la cuarta división celular, el embrión se dispone en dos capas, una externa y una interna; la capa interna da lugar a las tres hojas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo), es decir, al embrión propiamente dicho, mientras

2. INTRODUCCIÓN

que la externa da lugar a los tejidos extraembrionarios, sin los cuales, no es posible el desarrollo del embrión. Se obtienen, por tanto, de la masa celular interna del blastocisto.

3. Multipotenciales: tienen una capacidad de diferenciación más restringida, siendo capaces de dar lugar a las células de los tejidos procedentes únicamente de la misma capa embrionaria. Se encuentran en los tejidos fetales.

Las células madre totipotenciales, junto con las pluripotenciales obtenidas del blastocisto, se denominan células madre embrionarias, ya que sólo se encuentran en el embrión, mientras que las células madre multipotenciales, además de en tejidos fetales (células madre fetales), han sido encontradas, aisladas y cultivadas a partir de organismos adultos (células madre adultas).

El aislamiento y cultivo de células madre humanas se consiguió por primera vez en 1998, de forma simultánea por los equipos de James Thomas (Universidad de Wisconsin, EE.UU.), que obtuvieron las células de la masa interna del blastocisto, y de John D. Gearhart (Universidad Johns Hopkins, EE.UU.), que las obtuvieron a partir de tejido fetal de mujeres embarazadas^{152,153}.

Las células madre adultas se encuentran en tejidos órgano-específicos y hasta hace poco, se pensaba que estaban determinadas para dar lugar a tipos de células especializadas de ese tejido (células multipotenciales). Sin embargo, se ha comprobado que hay células madre en tejidos adultos con capacidad de transdiferenciación, es decir, con capacidad de dar lugar a múltiples líneas celulares de las tres capas embrionarias (células pluripotenciales).

La capacidad de transdiferenciación, junto con la habilidad de migrar desde sus tejidos de origen hacia tejidos dañados, así como su amplia distribución en los tejidos del adulto — que las convierte en una fuente accesible — y su exención de problemas éticos, revelan el gran potencial de las células madre adultas en el proceso de regeneración tisular y explican el gran auge que ha tenido la denominada “Medicina Regenerativa”.

2.2.1. Células madre mesenquimales derivadas de adipocitos

Uno de los tejidos más estudiados como banco celular es la médula ósea, en la que además de la población de células madre hematopoyéticas, existe otra población de células a las que en un principio tan sólo se les atribuyó una función de soporte: las células madre mesenquimales (*mesenchymal stem cells*, MSCs).

Desde su descubrimiento a finales de los años '60 por Friedenstein et al.¹⁵⁴, las MSCs de médula ósea constituyen una fuente muy importante de células madre adultas, a partir de las cuales se ha logrado obtener diferentes líneas celulares mediante diferenciación *in vitro*, como adipocitos, miocitos, condrocitos, osteocitos, células con fenotipo neuronal, células productoras de insulina, glucagón y somatostatina, cardiomiocitos, células endoteliales vasculares, células epiteliales y hepatocitos^{155,156,157,158,159,160,161,162,163}.

En el año 2006, el *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* propuso como criterios mínimos para definir las MSCs humanas¹⁶⁴:

1. Adherentes a plástico en condiciones estándar de cultivo.
2. Deben expresar: CD105, CD73 y CD90.
3. No deben expresar: CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79alpha o CD19 ni HLA-DR.
4. Deben diferenciarse a osteoblastos, condroblastos y adipocitos *in vitro*.

Sin embargo, esta definición ha quedado obsoleta ya que no permite diferenciar entre MSCs y fibroblastos y, actualmente, se proponen otros marcadores para obtener cultivos purificados (tabla 11): CD10, CD26, CD106, CD146, ITGA11, STRO-1, Gangliósido GD2, etc.

2. INTRODUCCIÓN

Marcador de superficie	MSCs	Fibroblastos
CD9, CD13, CD29, CD44, CD49a, CD49b, CD54, CD71, CD73, CD90, CD105, CD164, CD166	+	+
CD11a, CD14, CD16, CD31, CD33, CD34, CD43, CD45, CD86, CD117, CD133, CD184, CD85k, HLA-DR	-	-
CD10, CD106, CD146, ITGA11	+	-
CD26	Variable	+

Tabla 11. Comparación de la expresión de marcadores de superficie entre MSCs y fibroblastos. Modificado de Kundrotas, 2012¹⁶⁵.

Al inyectar de manera intravenosa MSCs, en ausencia de una agresión al organismo, éstas tienden a migrar a la médula ósea, donde permanecen quiescentes^{166,167}. Sin embargo, tras una agresión que desencadene una respuesta inflamatoria, existe un reclutamiento de MSCs en sangre periférica que migran al lugar de origen de la inflamación y se integran en el tejido dañado^{168,169,170,171,172}, pero estudios *in vivo* han demostrado que la repoblación de los tejidos dañados por diferenciación de las células madre es < 5%, indicando que el papel que estas células desempeñan en los fenómenos de reparación y regeneración tisulares se basa en otros mecanismos, como el control sobre los mecanismos reguladores de la inflamación^{173,174,175,176}.

De hecho, el efecto inmunomodulador de las MSCs es una propiedad bien caracterizada. Las MSCs son, tanto *in vitro* como *in vivo*, no-inmunogénicas, capaces de evadir al MHC (complejo mayor de histocompatibilidad, *del inglés Major Histocompatibility Complex*), incluso entre individuos genéticamente diferentes, y capaces de inhibir la proliferación de linfocitos inducida por linfocitos alogénicos, la maduración, proliferación y activación de las células dendríticas y suprimir la proliferación, producción de citoquinas y citotoxicidad de las células NK (Natural Killers), lo que les ha valido el sobrenombre de “supresoras universales del sistema inmunológico”^{177,178,179,180}.

Esta capacidad inmunomoduladora tiene especial relevancia a la hora de tratar enfermedades o trastornos en los que se exagera la acción del sistema inmunológico, como ha sido constatado en diferentes estudios, como por ejemplo, esclerosis múltiple¹⁸¹, enfermedad de Crohn¹⁸², artritis reumatoide¹⁸³ o

2. INTRODUCCIÓN

enfermedad injerto contra huésped¹⁸⁴, pero también en modelos de daño orgánico: lesión pulmonar aguda^{185,186}, lesión renal aguda^{187,188,189}, e insuficiencia hepática aguda^{190,191}. Existe en la actualidad un ensayo clínico en fase I/II en el que se están utilizando MSCs de médula ósea (BMSCs) tras un trasplante renal o hepático con el objetivo de disminuir las dosis de fármacos inmunosupresores¹⁹².

Estudios novedosos destacan la presencia e importancia de las microvesículas producidas por las MSCs (partículas de 50 – 200 nm), que actúan como vehículos mensajeros transportando mRNA, micro RNA (miRNA) o proteínas capaces de reprogramar células dañadas e inducir la secreción de factores citoprotectores^{193,194,195,196,197,198}.

Además del efecto inmunomodulador, las MSC también poseen propiedades antimicrobianas, secretando péptidos con acción antibacteriana, catabolizando el triptófano mediante la indolamina-2,3-dioxigenasa o aumentando la presencia y capacidad fagocítica de los neutrófilos¹⁹⁹ y que podrían aportar un valor añadido en aquellas patologías en las que la sobreinfección es frecuente o grave, como sucede en la IHA.

Pero la médula ósea no es la única fuente de MSCs, y se han encontrado células mesenquimales con la misma morfología y capacidad de diferenciación en otros tejidos, como el adiposo (ASCs), que supone una fuente mucho más accesible y extensa de MSCs^{157,158,159,160,163,200,201,202,203,204} y que sólo se diferencian en algunos marcadores de superficie. Así, las ASCs expresan CD49d (integrina alfa4) y las de médula ósea no y, por el contrario, las MSCs de médula ósea (BMSCs) expresan CD106 (VCAM), marcador que no tienen las ASCs^{155,205}. Existen además muchos escenarios clínicos en los que se está aplicando la terapia celular con células madre derivadas de tejido adiposo, como se observa en la tabla 12²⁰⁶.

Nuestro grupo de trabajo ha publicado numerosos artículos originales y de revisión sobre el uso de las ASCs en diferentes escenarios^{13,15,16,18,19,20,182,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218}, así como realizado tres ensayos clínicos correspondientes a Fase I¹⁴, Fase II¹⁷ y Fase III²¹⁹ en los que se han implantado células madre adultas autólogas derivadas de tejido adiposo para el tratamiento de fístulas perianales complejas.

2. INTRODUCCIÓN

A. ASC Research Activity	References
Adipose tissue	Mauney et al., 2007
Bone tissue	Cowan et al., 2004; Dusa et al., 2006; Yoon et al., 2007
Cartilage	Dragoo et al., 2003; Guilak et al., 2004
Skeletal muscle	Bacou et al., 2004; Goudenege et al., 2009
Smooth muscle	Rodríguez et al., 2006
Neural	Ashjian, 2003; Safford et al., 2004; Erba et al., 2009; Nakada et al., 2009
Vocal fold/laryngeal tissue	Kumai et al., 2009; Long et al., 2009
Bladder/urethra	Jack et al., 2005
Cardiovascular tissue/vascular tissue	Miranville et al., 2004; Heydarkham-Hagvall et al., 2008; Froehlich et al., 2009; Okura et al., 2009
Hematopoietic	Cousin, 2003; Puissant et al., 2005
Pancreatic tissue/islet development	Timper et al., 2006; Okura et al., 2009; Kajiyama et al., 2010
Hepatic tissue	Seo et al., 2005; Banas et al., 2007; Okura et al., 2009
Epithelial/skin tissue	Brzoska et al., 2005; Jeong, 2009
Kidney tubule epithelial cell	Li et al., 2009
B. ASCs in disease and injury	References
Intervertebral disc repair	Hsu et al., 2008
Spinal cord injury	Ryu et al., 2009
Peripheral nerve regeneration	di Summa et al., 2009
Glioblastoma treatment	Josiah et al., 2010
Huntington's disease	Lee et al., 2009
Multiple sclerosis	Riordan et al., 2009
Stroke	Kim et al., 2007
Urinary incontinence	Lin et al., 2010
Erectile dysfunction	Lin et al., 2009
Liver repair	Liang et al., 2009
Diabetes	Lin et al., 2009
Colitis	González-Rey et al., 2009
Ischemia	Kondo et al., 2009
Rheumatoid arthritis	González-Rey et al., 2010
Antiaging	Park et al., 2008
Wound healing/skin regeneration	Trottier et al., 2008
Cleft palate	Conejero et al., 2006
Tendon repair	Uysal and Mizuno, 2009

2. INTRODUCCIÓN

C. ASC Human Trials	References
Calvarial defect	Lendeckel et al., 2004
Crohn's disease	García-Olmo et al., 2009; Taxonera et al., 2009
Urinary incontinence	Yamamoto et al., 2009
Graft vs. Host disease	Fang et al., 2007

Tabla 12. Resumen de las aplicaciones de las ASCs. A. Áreas de investigación con ASCs. B. Patologías en las que se han utilizado ASCs (experimental). C. Ensayos clínicos con ASCs. Modificado de Zuk, 2010²⁰⁶.

Todos los trabajos confirman que su obtención y cultivo son factibles, así como que son seguras en la práctica clínica y carecen de conflictos éticos²²⁰.

2.2.2. Terapia celular e insuficiencia hepática aguda

La limitada disponibilidad de órganos para trasplante frente a la demanda, el éxito conocido en el uso de células hematopoyéticas para el tratamiento de discrasias sanguíneas y la falta de eficacia de los dispositivos de asistencia hepática extracorpórea en términos de supervivencia, son los elementos fundamentales que han conducido al desarrollo de la terapia celular como posible tratamiento alternativo de diversas enfermedades hepáticas y que tiene las ventajas teóricas frente al TOH de poder expandir las células in vitro — eliminando el factor limitante de la escasez de donantes —, poder manipularlas genéticamente, ser administradas sin necesidad de una cirugía y ser obtenidas del mismo paciente, eliminando también los factores inmunológicos de rechazo y necesidad de terapia inmunosupresora de por vida.

El soporte de la función hepática mediante células madre se está ensayando en tres categorías de enfermedad: el fallo hepático agudo, las enfermedades metabólicas hepáticas y la cirrosis. Y aunque en las tres se han realizado estudios aislados en humanos, los resultados son dispares y la mayor parte de la terapia celular en estos casos se ha realizado con células hepáticas diferenciadas, es decir, con hepatocitos adultos, ya que el objetivo que se busca es una célula que de forma inmediata pueda asumir las funciones propias del órgano dañado, en este caso, el hígado.

Trasplante de hepatocitos maduros

El trasplante de hepatocitos maduros ha sido la primera línea de investigación en terapia celular para el tratamiento de enfermedades hepáticas congénitas, crónicas y agudas, incluyendo la IHA, y sigue siendo el principal modelo de tratamiento, ya que el principal mecanismo de regeneración y repoblación del hígado consiste en la proliferación de los hepatocitos maduros y cuya capacidad clonogénica les ha valido el sobrenombre de “células madre hepáticas funcionales” ²²¹.

Desde que Howard et al.²²² aislaran por primera vez en 1967 hepatocitos de rata y Berry y Friend describieran en 1969 la perfusión de colagenasa utilizada en la actualidad para aislarlos²²³, muchos han sido los estudios realizados en este campo, incluyendo el primer trasplante de hepatocitos (TCH) en animales, realizado en 1976 en un modelo de metabolopatía en rata por Matas et al.²²⁴ y el primero en un modelo de IHA, también de rata, en 1977 por Sutherland²²⁵. Es de destacar el modelo desarrollado por Kobayashi et al. en el año 2000, en el que la infusión intraesplénica en ratas del 5% de la masa hepática de hepatocitos humanos reversiblemente inmortalizados tras una hepatectomía del 90%, que hubiera conducido inevitablemente a la muerte por IHA, logró garantizar la supervivencia a corto plazo de los especímenes merced a un adecuado soporte metabólico²²⁶.

Los primeros casos de TCH en humanos datan de 1992 y 1998, en dos adultos cirróticos y en una niña con enfermedad de Crigler-Najjar tipo I, respectivamente^{227,228}. En la actualidad, existen más de 40 casos de IHA publicados tratados con trasplante de células hepáticas²²⁹.

Sin embargo, la mayoría de las publicaciones hacen referencia a casos clínicos sin unanimidad de criterios respecto a las indicaciones, metodología, criopreservación celular o valoración de la respuesta al TCH, por lo que en 2013 se realizó una conferencia de consenso²³⁰.

Entre las diferentes cuestiones abordadas en esta conferencia se encuentran: las fuentes de obtención de los hepatocitos, las indicaciones del TCH (tabla 13), el aislamiento y valoración de la viabilidad de los hepatocitos, su criopreservación, el

2. INTRODUCCIÓN

control de calidad de los mismos, la técnica de TCH y la valoración de la integración de los hepatocitos en el órgano receptor o “engraftment”²³⁰.

En la actualidad, la principal fuente de obtención de hepatocitos son los hígados descartados para TH procedentes de donante cadáver, lo que limita mucho su uso por la escasa cantidad que supone y por la baja calidad de las células²³¹ y pobre supervivencia, agravadas por la necesidad de criopreservación, que aumenta el número de pérdidas y disminuye su funcionalidad. Por ello, se han buscado otras fuentes de hepatocitos maduros como injertos de donantes tras parada cardíaca con menos de 40 minutos de isquemia caliente, el segmento IV hepático tras “split” para 2 receptores, reducciones hepáticas, incluso donantes en asistolia, donante neonatal o tras trasplante dominó por metabolopatías.

Patologías	
Errores congénitos del metabolismo	Fallo hepático agudo
Síndrome de Crigglar-Najjar tipo I	
Hipercolesterolemia familiar	
Déficit de factor VII	
Glucogenosis tipo 1a	
Enfermedad de Refsum	
Colestasis intrahepática familiar tipo 2	
Defectos del ciclo de la urea	AoCLF (fallo hepático agudo sobre crónico)
Déficit de ornitín transcarbamilasa	Déficit de alfa-1 antitripsina
Déficit de argininosuccinato liasa	Cirrosis hepática
Déficit de carbamil fosfatasa sintetasa tipo 1	Alcohólica
Citrulinemia	Vírica

Tabla 13. Patologías en las que se ha realizado el TCH. Modificado de Pareja et al., 2014²³⁰.

2. INTRODUCCIÓN

Las líneas actuales de investigación, sin embargo, están centradas en la obtención de hepatocitos procedentes de células progenitoras de origen hepático — células hepáticas de origen fetal o hepatoblastos y células progenitoras hepáticas o células ovals — o derivados de células madre progenitoras pluripotentes — células madre embrionarias (ESC), MSCs y células madre pluripotenciales inducidas (iPS) —, debido a la escasez de hepatocitos maduros, pese a la ampliación de fuentes donantes, por su dificultad de proliferación *in vitro* y problemas asociados a la criopreservación, y a los efectos de inmunomodulación y capacidad mayor de supervivencia de las células madre.

El TCH se realiza mediante un número variable de infusiones de células recién obtenidas o criopreservadas, a través de un catéter alojado en la vena porta o en la arteria esplénica, según la patología. Es necesaria la compatibilidad AB0 y la inmunosupresión con corticoides e inhibidores de la calcineurina²³⁰. Ésta última podría evitarse mediante la utilización de hepatocitos encapsulados en microesferas de alginato e infusión intraperitoneal, aunque se trata aún de un abordaje experimental²³².

Previo al TCH, es necesario determinar la viabilidad celular mediante el test de exclusión de azul-tripán. Se considera aceptable una viabilidad del 80% antes de la criopreservación y del 60% después de la descongelación. Sin embargo, la criopreservación es un procedimiento que produce daños mitocondriales en las células congeladas, a pesar de que algunos protocolos, como el del King's College, hayan logrado hasta 3 años de criopreservación sin pérdida de la función hepatocelular²³³. Los daños asociados a la criopreservación pueden mitigarse parcialmente mediante la adición de sustancias quelantes del hierro, como la desferoxamina, y soluciones ricas en iones²³⁴, pero se siguen prefiriendo células no criopreservadas²³¹.

La cuantificación de la calidad de los hepatocitos, además de su viabilidad, se ha convertido en un objetivo de máximo interés, para seleccionar aquellas células que presenten el mejor perfil metabólico para cada patología concreta en la que van a ser aplicadas. Así, se propone realizar estudios de determinación de la producción de ATP, de la ureogénesis, de la metabolización de fármacos por el citocromo P-

2. INTRODUCCIÓN

450, de la respiración celular, del estrés oxidativo, de la apoptosis, etc²³⁵. Pero, por desgracia, aún desconocemos los parámetros de calidad celular que mejor se correlacionan con la integración celular y el éxito del TCH²³⁰.

Este último parámetro, la integración celular, es crucial para el éxito del TCH, así como determinar la funcionalidad de las células trasplantadas en el receptor, mediante la determinación de la actividad enzimática deficitaria. Se ha demostrado en estudios experimentales que, entre el 70% y el 90% de los hepatocitos trasplantados son eliminados de los sistemas portal y sinusoidal hepáticos en las primeras 48h postrasplante por el sistema inmunológico y otros eventos sinusoidales^{230,236}, por lo que actualmente, se están investigando diversas formas de acondicionar el hígado previamente al TCH, con el objeto de aumentar el número de células que aniden en él; entre otras, destacan la irradiación y la embolización portal^{237,238,239}.

Es posible que células con mayor potencial de crecimiento, como las células ovas, los hepatoblastos o las iPS, tengan una mayor capacidad de integración y son, como hemos comentado, las actuales líneas de investigación.

Actualmente hay en marcha un ensayo clínico en fase I, llevado a cabo en la Universidad de Pittsburg, en el que reclutan pacientes con IHA de entre 0 y 21 años que serán tratados mediante trasplante de hepatocitos maduros²⁴⁰.

Trasplante de hepatocitos fetales o hepatoblastos

Los hepatocitos fetales son células que aparecen en el divertículo hepático a partir de la cuarta semana de gestación, derivadas de células madre pluripotenciales hepatogénicas, y son capaces de diferenciarse *in situ* en hepatocitos maduros una vez trasplantados en algunos modelos animales²³¹. Este hecho, junto a su alta capacidad de proliferación, las convierten en una fuente alternativa de células para su uso en el tratamiento de enfermedades hepáticas.

Su aislamiento y cultivo en humanos, provenientes de tejido hepático fetal donado después de abortos realizados bajo indicación médica, así como su uso clínico en

2. INTRODUCCIÓN

casos de hígado graso agudo asociado al embarazo, insuficiencia hepática aguda y cirrosis terminal, ya han sido publicados^{241,242,243,244}. Sin embargo, cuestiones como la diferenciación o funcionalidad tras el trasplante, no están aún del todo aclaradas en el modelo humano.

En diversos modelos murinos los hepatoblastos trasplantados, una vez separados de los progenitores hematopoyéticos que constituyen otra gran población celular en hígados fetales, han logrado tasas de repoblación de hasta el 80% de la masa hepática²⁴⁵, e incluso se han observado fenómenos de apoptosis en los hepatocitos deficitarios del receptor, inducidos por las células donantes²⁴⁶, lo cual podría tener especial interés en el tratamiento de enfermedades metabólicas. Pero, en algunos estudios como el de Haridass et al.²⁴⁷ en el que se utilizan hepatoblastos humanos, la tasa de repoblación es inferior a la alcanzada con hepatocitos maduros.

No obstante, para muchos pacientes su origen podría no ser aceptable y, por tanto, las consideraciones éticas hacen que esta fuente no esté actualmente disponible en nuestro entorno.

Trasplante de células madre adultas de origen hepático

Células progenitoras hepáticas o células ovals

En 1956, Farber describió por primera vez una población de células con capacidad pluripotencial del hígado y las denominó células ovals por su morfología²⁴⁸, aunque su terminología resulta confusa en la literatura.

Las células ovals se localizan en los canales de Hering o sistema ductular biliar terminal (figura 6), lugar en el que el epitelio biliar entra en contacto con los cordones de hepatocitos. Estas células tienen dificultad para autoregenerarse, por lo que algunos autores no las consideran verdaderas células madre, sino células progenitoras hepáticas (HPC) o células amplificadoras transitorias, bipotenciales, capaces de diferenciarse tanto en hepatocitos como en colangiocitos ante determinados estímulos, especialmente mediados por la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF).

2. INTRODUCCIÓN

Sin embargo, gran cantidad de trabajos y estudios han sido publicados a cerca de las células provenientes de los canales de Hering por su carácter *stem cell-like*, y desde un punto de visto inmunofenotípico, parece que existen diferentes subpoblaciones celulares, con marcadores diferentes y que apuntan, por tanto, a orígenes también diferentes.

Por un lado, la α -fetoproteína (AFP), un marcador característico de los hepatocitos fetales, está presente en menos de un 0,01% de las células de un hígado adulto. Las células ovales clásicas descritas por Farber expresan este marcador, así como Thy-1 o CD90, un marcador de estirpe hematopoyética que recuerda el origen íntimamente ligado de los precursores hematopoyéticos y hepáticos. Sin embargo, tanto en las placas ductales en hígados fetales y neonatales, como en los canales de Hering en hígados pediátricos y adultos, existen células progenitoras que son AFP negativas y CD90 negativas, pero que son positivas para CK-19 (citoqueratina 19), un marcador de epitelio biliar, y para EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule)²⁴⁹ y que algunos autores consideran como las precursoras de los hepatoblastos. Una subpoblación de estas células además expresa albúmina.

Así pues, dependiendo del modelo utilizado y del tipo de daño hepático realizado, existen diferentes tipos de “células ovales”, por lo que en conjunto se prefiere hablar del “compartimento oval” o de “células madre/progenitoras hepáticas residentes”, para hacer referencia al *pool* de células en el hígado adulto con capacidad de comportarse como una célula madre. Una de las cuestiones más importantes que surge es cómo el hígado selecciona en función del tipo y gravedad de la lesión el tipo de respuesta celular para la regeneración²⁵⁰.

Las células del compartimento oval, habitualmente quiescentes, se activan para posteriormente y tras la fase de proliferación o amplificación en la que forman cordones de epitelio biliar, migrar y diferenciarse. La activación de las células ovales depende fundamentalmente de la incapacidad de los hepatocitos maduros para proliferar, mecanismo fundamental de regeneración y repoblación del hígado. Esto sucede ante diversas enfermedades hepáticas crónicas, no así, de manera al menos significativa, en la IHA, aunque existen fuertes contradicciones en cuanto al papel que desempeñan las HPC en la regeneración hepática; desde estudios en los

2. INTRODUCCIÓN

que se consideran fundamentales, incluso en la IHA²⁵¹, hasta publicaciones recientes en las que la reacción ductular — activación del compartimento oval — vista en las hepatopatías crónicas, no es capaz de regenerar el parénquima y se debe, en parte, a fenómenos de desdiferenciación de hepatocitos maduros^{252,253}.

Lo que es cierto es que su rol está insuficientemente estudiado²⁵⁴ y que puede que muchos de estos trabajos realizados en ratones y ratas no sean equiparables a las enfermedades hepáticas humanas²³⁶.

Desde un punto de vista teórico, dada su capacidad de diferenciación tanto a hepatocitos como a colangiocitos, son células con un gran potencial para su uso en el tratamiento de enfermedades hepáticas y, por ello, han sido ampliamente estudiadas en modelos animales^{255,256}.

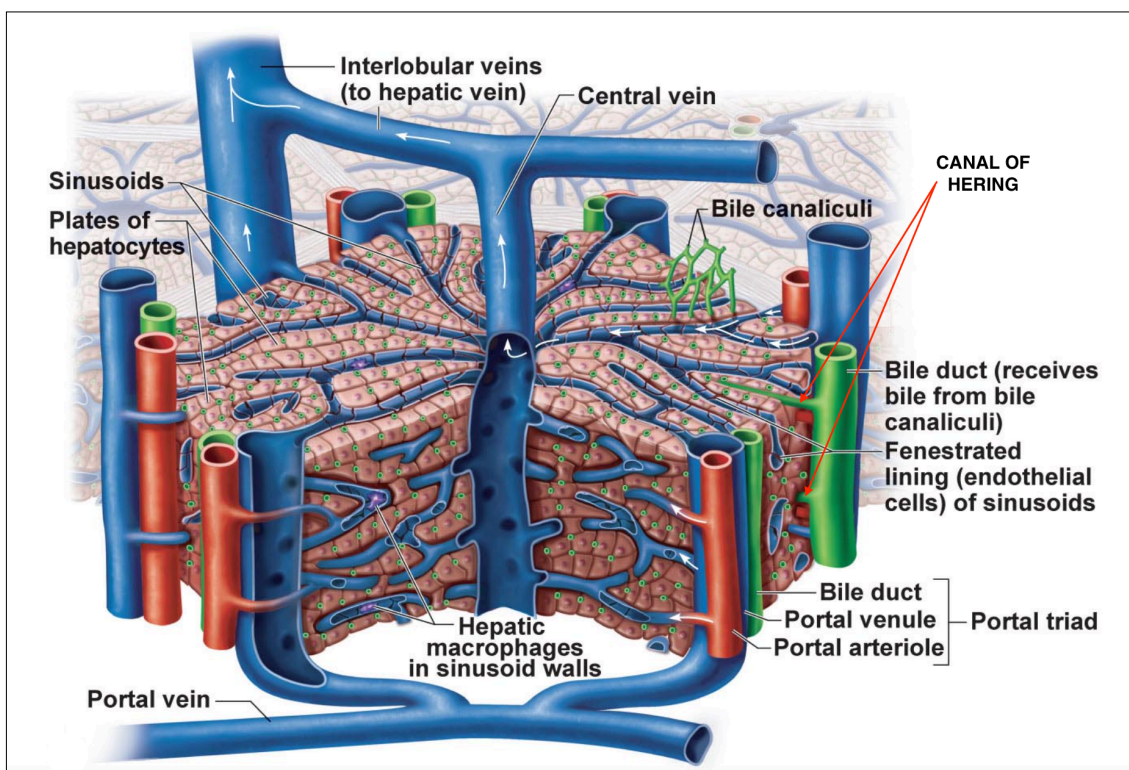


Figura 6. Representación tridimensional del lobulillo hepático y de la red sinusoidal y canicular biliar, que desemboca en los canales de Hering y, éstos a su vez, en los conductos biliares. Modificado de E. Marieb and K. Hoehn, Human Anatomy & Physiology, 9th edition; Pearson 2012²⁵⁷

Además de haber demostrado su capacidad de integrarse en el parénquima hepático del receptor y tener actividad funcional, presentan la ventaja de una gran estabilidad cromosómica durante cultivos prolongados²³⁶. Sin embargo, el principal factor limitante para el desarrollo de la terapia celular con este linaje es compartido con el de los hepatoblastos; las células ovales a penas representan el 0,5% de la masa celular hepática de una persona adulta, por lo que su aislamiento es excesivamente difícil en comparación con otros tipos celulares²³¹.

Trasplante de células madre de origen no hepático

Células madre mesenquimales derivadas de médula ósea y tejido adiposo (BMSCs y ASCs)

Las células madre mesenquimales se están utilizando a nivel clínico en diversas patologías^{258,259,260}, pero en la mayoría de los casos y en concreto en relación a la patología hepática, sólo las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea han sido utilizadas hasta la fecha. Por tanto, sobre el efecto de las ASCs en la IHA sólo disponemos de evidencia en modelos experimentales, y la mayoría de ellos, además, en pequeños animales (ratas y ratones).

Asimismo, las series de casos y ensayos clínicos publicados con BMSCs son en pacientes con hepatopatías crónicas de diverso origen o con AoCLF, ninguno en IHA (tabla 14)²⁶¹, y con diversos resultados. En general, se considera como una terapia prometedora al mejorar, aunque sea de forma leve, algunos parámetros bioquímicos y la puntuación del MELD score. El trabajo de Mohamadnejad et al.²⁶², por el contrario, concluye que su uso no tiene un efecto beneficioso, pero que el tamaño muestral fue probablemente insuficiente.

En el trabajo publicado por Gasbarrini et al.²⁶³, un caso de IHA — inducida por toxicidad con Nimesulida, un antiinflamatorio no esteroideo COX-2 selectivo—, la selección de las células se realizó por aféresis de células CD34+, tras la administración de G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor). El marcador de superficie CD34+ existe en algunas BMSCs, pero es esencialmente negativo en esta

2. INTRODUCCIÓN

población celular, al contrario de lo que sucede con las células madre hematopoyéticas. Éstas son positivas para CD34, aunque algunas puedan ser CD34 negativas. Por tanto, el único caso de tratamiento de IHA con células madre no es con células mesenquimales, sino con células madre de origen hematopoyético cuya diferenciación espontánea en hepatocitos *in vitro* y en casos de regeneración hepática a nivel experimental, aunque rara, está documentada²⁶⁴.

El trabajo de Peng et al.²⁶⁵, citado en algunos artículos de revisión — como el de Esrefoglu²⁶⁶ —, por ser uno de los estudios con mayor número de pacientes (53), se trata de un trabajo en pacientes con AoCLF, secundario a VHB, tratados con BMSCs autólogas y entre cuyos criterios de exclusión está la presencia de encefalopatía hepática, no siendo por tanto, representativo del espectro clínico de la IHA, aunque sí del potencial de la terapia celular en el campo de la hepatología.

En la actualidad, la entrada “mesenchymal stem cells” en el registro de ensayos clínicos “www.clinicaltrials.gov” devuelve 578 resultados. Existen once ensayos clínicos registrados bajo el epígrafe “liver failure”, de los cuales seis no tienen información alguna, dos se encuentran completados y son sobre cirrosis y AoCLF en realidad y tres se hallan en fase de reclutamiento, de los cuales, a su vez, dos son ensayos tras la realización de un TH y, el restante, es sobre fallo hepático en pacientes con infección por VHB, sin especificar si es IHA o AoCLF.

Existe, por tanto, un vacío en el estudio de las MSCs/ASCs en la IHA a nivel clínico.

Referencia	Tipo de estudio	nº pacientes	Etiología/Gravedad	Tipo/origen céls	Sitio inyección/nº céls
Park et al. Cytotherapy, 2013	Serie de casos	5	Mixta/ CTP B-C	MNCs (MSCs)/ aspirado MO	Arteria hepática/ 10 ⁶ -10 ⁷ /Kg
Amin et al. Clin Transplant, 2013	Serie de casos	20	VHC/ CTP C	MSCs/ aspirado MO	Intraesplénico/ 10 ⁷
Mohamadnejad et al. Liver Int, 2013	Casos-contrroles randomizado	15 12 controles	Mixta/ CTP A-C	MSCs vs placebo/ aspirado MO	Vena periférica/ 10 ⁸
Jang et al. Liver Int, 2013	Serie de casos	12	Alcohol/ CTP A-B	MSCs/ aspirado MO	Arteria hepática 10 ⁷
Salama et al. Stem Cell Res Ther, 2012	Casos-controles no randomizado	50 50 controles	VHC/ ESLD	HSCs/ Leucoféresis G-CSF	Porta/arteria hepática/ 10 ⁹
El-Ansary et al. Stem Cell Rev, 2012	Casos-controles no randomizado	15 10 controles	VHC/ CTP C	MSCs/ aspirado MO	Vena periférica/ 10 ⁶
Peng et al. Hepatology, 2011	Casos-controles no randomizado	53 105 controles	VHB	MSCs/ aspirado MO	Arteria hepática
Couto et al. Liver Int, 2010	Serie de casos	8	Mixta/ CTP B-C	MNCs/ aspirado MO	Arteria hepática/ 10 ⁹
Nikeghbalian et al. Arch Iran Med, 2011	Serie de casos	6	Mixta/ CTP C	MNCs-HSCs/ aspirado MO	Porta/ 10 ⁶ -10 ⁹
Salama et al. World J Gastroenterol, 2010	Casos-controles randomizado	90 50 controles	VHC	HSCs/ aspirado MO G-CSF	Porta/ 10 ⁷
Kim et al. Cell Transplantation, 2010	Serie de casos	10	VHB/ MELD 7-13	MNCs/ aspirado MO	Vena periférica/ 10 ⁸ /Kg
Lyra et al. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2009	Casos-controles randomizado	15 15 controles	Mixta/ CTP B-C	MNCs/ aspirado MO	Arteria hepática/ 10 ⁸
Kharaziha et al. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2009	Serie de casos	8	Mixta/ MELD > 10	MSCs/ aspirado MO	Porta/10 ⁸
Pai et al. Am J Gastroenterol, 2008	Serie de casos	9	Alcohol/ CTP B	HSCs/ Leucoféresis G-CSF	Arteria hepática/ 10 ⁸
Levicar et al. Cell Proliferat, 2008	Serie de casos	5	Mixta/ CTP A-B	HSCs/ Leucoféresis G-CSF	Porta/arteria hepática/ 10 ⁸
Mohamadnejad et al. World J Gastroenterol, 2007	Serie de casos	4	Mixta/ CTP B-C	HSCs/ aspirado MO	Arteria hepática/ 10 ⁶ -10 ⁹
Lyra et al. World J Gastroenterol, 2007	Serie de casos	10	Mixta/ CTP B-C	MNCs/ aspirado MO	Arteria hepática/ 10 ⁸
Terai et al. Stem cells, 2006	Serie de casos	9	Mixta/ CTP B-C	MNCs/ aspirado MO	Vena periférica/ 10 ⁹

Tabla 14. Estudios prospectivos de células madre de médula ósea en pacientes con cirrosis. Modificado de Margini et al., 2014²⁶¹. **CTP** Child Turcotte Pugh score; **MNCs** Mononuclear stem cells; **HSCs** Hematopoietic stem cells; **MSCs** Mesenchymal stem cells; **MO** médula ósea; **ESLD** End Stage Liver Disease; **MELD** Model for End Stage Liver Disease.

2. INTRODUCCIÓN

Células madre pluripotenciales inducidas (iPS)

Las células pluripotenciales inducidas son células que provienen de la reprogramación de células somáticas adultas, utilizando factores pluripotenciales, y que pueden dar origen a células de cualquiera de las tres capas germinales.

Los trabajos preliminares sobre reprogramación celular se basan en la transferencia de núcleos de células somáticas a oocitos no fertilizados²⁶⁷ o por fusión con células madre embrionarias²⁶⁸. En ambos casos se hipotetizaba la existencia de factores capaces no sólo de mantener la identidad de las células embrionarias, sino también de inducir pluripotencialidad a células somáticas.

Yamanaka y Takahashi²⁶⁹ fueron capaces de crear iPS, a partir de fibroblastos de piel de ratón, mediante la expresión de cuatro factores de transcripción, conocidos como los factores de Yamanaka o Y4: Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc (OSKM). Para ello crearon material transgénico mediante el uso de retrovirus como vectores. La potencial integración aleatoria de estos retrovirus y el material transgénico resultante genera ciertas alarmas sobre el posible aumento del riesgo de desarrollo de tumores.

Por ello, nuevas estrategias basadas en la transfección celular de los factores de Yamanaka están siendo desarrollados, como el uso de péptidos penetrantes celulares (fragmento peptídico del transactivador de la transcripción del VIH), virus recombinantes episomales (adenovirus o virus Senaï), transfección del mRNA o plásmidos sin componente bacteriano ("*minicircles*")²⁷⁰.

Una segunda forma de reprogramación celular, no basada en los factores clásicos de Yamanaka, consiste en la sobreexpresión de micro RNA (miRNAs), pequeñas moléculas no codificantes de RNA con funciones de silenciar RNA y regulación postranscripcional de la expresión génica²⁷⁰.

El desarrollo de estas células, que tienen la ventaja ética de no provenir de embriones ni fetos y que, al obtenerse a partir del mismo individuo en el que se van a utilizar, tienen también la potencial ventaja de evitar el fenómeno de rechazo del injerto y la necesidad de inmunosupresión, fue merecedor del Premio Nobel de

2. INTRODUCCIÓN

Fisiología o Medicina de 2012, concedido de forma conjunta a Shinya Yamanaka y a John Bertrand Gurdon.

Desde su descubrimiento, gran cantidad de células se han utilizado como fuente para su obtención, incluso hepatocitos²⁷¹, siendo las principales las BMSCs y ASCs²⁷², aunque por la necesidad de un procedimiento invasivo para su obtención, actualmente se está generalizando la obtención de células madre hematopoyéticas circulantes en sangre periférica.

Igualmente, gran variedad de células se han intentado obtener a partir de las iPS, con objeto de ser utilizadas como terapia celular, entre las cuales se encuentran tanto las MSCs²⁷³ como los hepatocitos²⁷⁴. Sin embargo, las células hepáticas obtenidas a partir de iPS con los métodos actuales, pese a que tienen algunas características morfológicas y fenotípicas similares a los hepatocitos maduros — ser capaces de integrarse en el parénquima hepático —, y poseer algunas de las capacidades funcionales de éstos, como la producción de urea o albúmina y la síntesis de α -1-antitripsina, no poseen el grado de maduración suficiente para desarrollar todas las funciones celulares propias, como lo demuestra el déficit de actividad de enzimas detoxificantes como CYP2A6 o CYP3A4.

Esta inmadurez funcional junto a otras propiedades, como la expresión de AFP, las asemejan más a hepatocitos en estadios menos diferenciados, como los fetales, y hace que se les denomine células “*hepatocyte-like*” (HLC)²⁷⁵.

Lamentablemente, en la actualidad se desconocen con exactitud los procesos que llevan a un hepatocito fetal o inmaduro a madurar y diferenciarse en un hepatocito adulto²⁷⁰ y a pesar de que a nivel preclínico existe ya extensa información y literatura²⁷⁶ y de que todos los esfuerzos en el campo de la terapia celular hepática están puestos en lograr mejorar la diferenciación de las HLC-iPS, hoy por hoy supone una barrera que está enlenteciendo su aplicabilidad clínica.

Otras fuentes celulares

Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias, obtenidas de la masa interna del blastocisto en mamíferos hacia el cuarto o quinto día posfertilización — entre 50 – 150 células aproximadamente —, tienen la capacidad de proliferar indefinidamente al mismo tiempo que mantienen su pluripotencialidad y capacidad de diferenciación en células de las tres capas embrionarias²⁷⁷. Las ESC humanas han sido objeto de estudio durante muchos años²⁷⁸ y de forma similar a las iPS, numerosos tipos de células han sido derivadas de ellas.

Existen protocolos de laboratorio para la obtención de células hepáticas a partir de ESC, pero al igual que sucede con las células derivadas de las iPS, fenotípica, metabólica y funcionalmente se asemejan más a los hepatocitos fetales que a los adultos y se consideran, por tanto, células *hepatocyte-like* con las mismas limitaciones de uso que las anteriores²⁷⁹.

En cualquier caso, las consideraciones éticas del uso de ESC hacen de esta fuente una de las líneas de investigación menos atractivas y rentables.

Hepatocitos xenogénicos

La falta de fuentes para la obtención de hepatocitos fue promotora de la investigación con células de otras especies, así como del xenotrasplante de órganos sólidos, pero los avances en la reprogramación celular están haciendo perder interés por ella.

El origen del xenotrasplante se remonta a principios del siglo XVII en Inglaterra y Francia, donde se realizaron las primeras transfusiones sanguíneas de animales a personas. Ya en 1966, Reemtsma publicó la supervivencia a 9 meses de pacientes que recibieron un trasplante renal de chimpancé²⁸⁰.

El principal factor limitante del trasplante entre especies diferentes es el rechazo inmunológico, tanto de forma hiperaguda, mediada por los anticuerpos naturales

2. INTRODUCCIÓN

IgM anti epítipo gal (galactosil α -(1,3)-galactosil β -1,4-*N*-acetyl glucosaminil), generados por la exposición y contacto con esta sustancia a través del tubo digestivo y que producen la activación del complemento y las células NK, como de forma aguda, por anticuerpos principalmente anti-gal ya de clase IgG amplificados y por la inmunidad celular mediada por el MHC, que en última instancia provocan fenómenos trombóticos y de coagulación intravascular diseminada. La posibilidad de manipulación genética de los organismos ha posibilitado la creación de individuos de especies sin el antígeno gal y que resultan prometedores, entre ellos el cerdo²⁸¹.

El cerdo, utilizado ya como fuente de válvulas cardíacas e insulina es también utilizado en los biorreactores de los dispositivos bioartificiales de soporte hepático que ya hemos comentado, y es más rápido y menos costoso de criar que primates no-humanos, además de presentar menos problemas éticos que estos últimos.

Existen también modelos animales en los que se ha logrado con éxito trasplantar hepatocitos xenogénicos²⁸². Sin embargo, además del problema del rechazo inmunológico, que pudiera corregirse mediante dosis mayores de inmunosupresión asumiendo sus riesgos, o mediante la microencapsulación con polímeros, existe otro problema fundamental: la correcta función tanto celular como de los productos sintetizados. El hígado produce un gran número de proteínas y muchas de ellas podrían no ser funcionantes entre especies, como la eritropoyetina y la renina porcinas, que no son funcionantes en humanos.

Otro ejemplo es la respuesta al TNF α ; los hepatocitos porcinos aumentan la producción de fibrinógeno y polímeros estables de fibrina mientras que los humanos realizan justo la acción contraria. Por tanto, queda aún mucho por recorrer en este campo de investigación, aunque con los datos preclínicos que hay, algunos prevén la puesta en marcha de ensayos clínicos en dos o tres años²⁸³.

2.3. MODELOS EXPERIMENTALES DE INSUFICIENCIA HEPÁTICA AGUDA

La baja casuística y la gravedad que reviste la IHA en seres humanos dificulta enormemente la realización de ensayos clínicos, obligando pues a recurrir al desarrollo y uso de modelos experimentales.

Los modelos creados, siendo necesario remontarse hasta hace casi cincuenta años para encontrar las primeras referencias, pueden clasificarse en tres categorías principales: quirúrgicos, farmacológicos e infectivos.

Las especies utilizadas para el estudio de la IHA son mamíferos de pequeño y mediano tamaño y son fundamentalmente cinco: ratones, ratas, conejos, perros y cerdos.

2.3.1. Modelos quirúrgicos

Hepatectomía total o parcial

El primer intento de desarrollo de un modelo experimental para el estudio de la fisiología hepática mediante una resección quirúrgica se llevó a cabo en 1921 en perros por Mann²⁸⁴.

Desde entonces, multitud de técnicas y especies animales han sido utilizadas para crear modelos de IHA, aunque éstas se podrían resumir en hepatectomías parciales, de mayor o menor extensión, y hepatectomías totales.

Los modelos anhepáticos (hepatectomía total) son buenos para el estudio de dispositivos bioartificiales, especialmente los modelos porcinos por su similitud en cuanto a peso corporal y proporciones con respecto al ser humano y su menor coste frente a otros^{285,286,287,288}, pero tienen el inconveniente de no tener la gran cantidad de sustancias proinflamatorias y tóxicas circulantes que se producen habitualmente en el contexto de la IHA y que son responsables en gran medida de la clínica de los pacientes. Además, en ausencia de TH, son modelos irreversibles,

2. INTRODUCCIÓN

por lo que tampoco permiten el estudio de tratamientos que potencialmente aumenten la supervivencia.

Sin embargo, es mérito de estos modelos el avance en las medidas de soporte, que actualmente, y en casos extremos, permiten mantener con vida a pacientes en situaciones anhepáticas hasta la llegada de un órgano para trasplantar. Estas situaciones pueden darse, no sólo en casos de IHA muy grave, sino en traumatismos hepáticos masivos (avulsión hepática) o tras un TH, ante el desarrollo de una disfunción primaria del injerto.

Algunos de los trabajos de hepatectomías totales más relevantes son el de Frank et al.²⁸⁹ en perros y el de Knubben et al.²⁹⁰ en cerdos. La importancia de estos trabajos radica en el desarrollo de una técnica quirúrgica en la que se preserva por primera vez la vena cava inferior durante la extracción, mediante un bypass portocava, mejorando enormemente las condiciones hemodinámicas y la supervivencia de los animales durante el procedimiento. El trabajo de Frank fue mejorado por Starzl²⁹¹, quien basado en estos trabajos experimentales en perros y en la experiencia del ya implantado programa de trasplante renal, perfeccionó la técnica de extracción y posteriormente implantación del hígado y dio lugar a la realización del primer trasplante hepático humano en 1963.

Otros modelos de hepatectomía total que merecen ser destacados son los de Azoulay et al.²⁹² en ratas, que describe una técnica de extracción en una sola fase mediante el uso de un injerto en "Y" cavo-renal de una rata donante, y que simplifica los hasta entonces complejos modelos de hepatectomía total en rata, en los que se requerían múltiples fases quirúrgicas y en los que la extracción hepática era muchas veces incompleta, el modelo de Daloze et al.²⁹³ en perros, en el que por medio de un shunt mesentérico-cava, se mantiene la integridad del tracto gastrointestinal y pancreático, y permite un adecuado estudio de la metabolización extrahepática de diferentes sustancias y el de Lempinen et al.²⁹⁴ en cerdos, quien utiliza por primera vez una prótesis vascular no trombogénica de PTFE-e (politetrafluoroetileno expandido o Gore-Tex®) para la reconstrucción de la vena cava.

2. INTRODUCCIÓN

Los modelos de IHA creados a partir de resecciones parciales remedarían la IHA que se puede producir en pacientes sometidos a una hepatectomía extensa, habitualmente por patología tumoral hepática primaria o metastásica, en los que el hígado remanente es incapaz de asumir las funciones metabólicas y de detoxificación. Sin embargo, muchos modelos de resección parcial exclusiva, es decir, no combinados con otras técnicas, son incapaces de provocar coma hepático y el cuadro clínico que generan no es, en muchas ocasiones, representativo. Por el contrario, permiten un estudio exhaustivo de los procesos de regeneración hepática²⁹⁵, aunque alcanzar el equilibrio entre el desarrollo de IHA y permitir la capacidad regenerativa del hígado es una dificultad añadida en estos modelos.

Dado que la regeneración hepática depende de un gran número de factores, como la edad, el sexo o incluso los ritmos circadianos, estos modelos deben realizarse bajo estrictas condiciones experimentales, y que pueden ser causa de una difícil estandarización de los mismos.

En general, se asume que una hepatectomía del 85% – 90% en ratas es suficiente para inducir una IHA, pero la corrección estricta de la hipoglucemia es capaz, por sí sola, de aumentar la supervivencia y ser necesarias resecciones de hasta el 95%²⁹⁶. En modelos de mayor tamaño y, por tanto, organismos más complejos como los cerdos, la resección necesaria para inducir un cuadro de IHA es menor, rondando el 70% – 80% del volumen hepático total.

La combinación de resecciones hepáticas con el uso de tóxicos, como la galactosamina o el paracetamol, o con shunts vasculares del remanente son una alternativa a los modelos exclusivamente resectivos^{288,297} y tienen la doble ventaja de necesitar una resección de menor tamaño, siendo por tanto técnicamente menos demandantes y disminuyendo el riesgo de mortalidad intraoperatoria, y de liberar al torrente sanguíneo sustancias tóxicas y proinflamatorias que producen un cuadro clínico de mayor parecido al que se observa en seres humanos.

Como hemos comentado, los animales grandes como el cerdo, pero también perros y ovejas, tienen una anatomía y fisiología más parecida a la de los seres humanos y, por tanto, serían los modelos quirúrgicos ideales, pero un factor importante que limita su universalización y que favorece el uso de modelos con animales pequeños

2. INTRODUCCIÓN

(ratones, ratas, conejos, etc.), es la escasez de herramientas inmunohistoquímicas para el procesamiento de muestras sanguíneas e histológicas y su elevado coste cuando se compara con las existentes para los segundos²⁹⁸.

En la figura 7 se muestra la anatomía hepática de la rata (Sprague-Dawley).

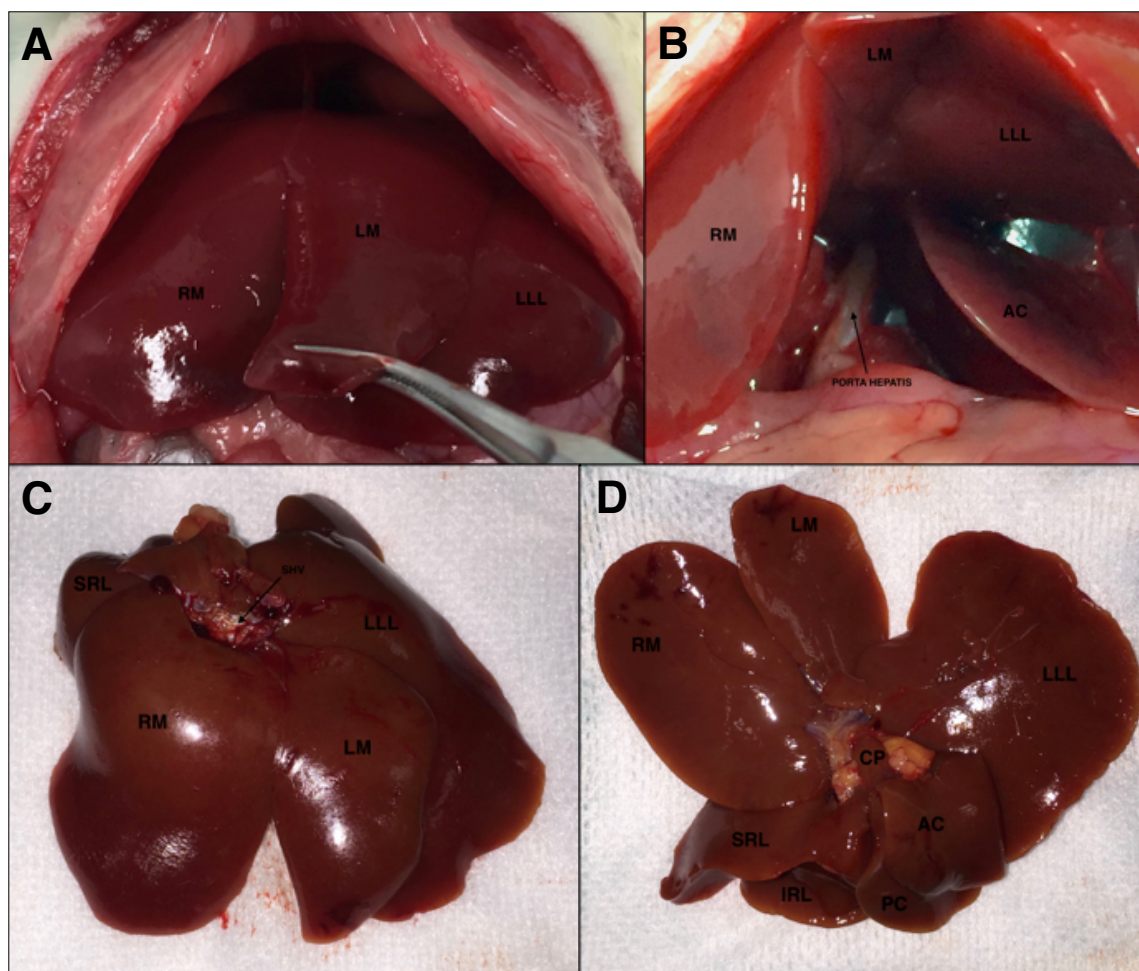


Figura 7. Anatomía hepática de la rata.

In situ: **A** superficie anterior. **B** superficie inferior

Ex situ: **C** superficie anterior. **D** superficie inferior

RM lóbulo medio derecho; **LM** lóbulo medio izquierdo; **LLL** lóbulo lateral izquierdo; **SRL** lóbulo superior derecho; **IRL** lóbulo inferior derecho; **AC** lóbulo caudado anterior (superior); **PC** lóbulo caudado posterior (inferior); **CP** proceso caudado; **SHV** venas suprahepáticas.

Desvascularización completa o transitoria

La desvascularización hepática completa consiste en la derivación del flujo esplácnico por medio de una anastomosis porto-cava y de la ligadura permanente

2. INTRODUCCIÓN

de la arteria hepática, asociada o no a la ligadura de otras colaterales y de la vía biliar principal. Mediante esta técnica, a diferencia de los modelos resectivos, se ha conseguido recrear la encefalopatía hepática y el aumento de la presión intracraneal, lo cual permite el estudio de las complicaciones neurológicas asociadas a la IHA²⁹⁵.

Aunque este procedimiento conduce inevitablemente a la muerte del animal, crea una ventana terapéutica suficientemente amplia — entre 6h – 12h — durante la cual poder estudiar diferentes tratamientos y el uso de dispositivos bioartificiales^{299,300,301}. Se han creado modelos con perros y ratas, pero el más ampliamente utilizado es el cerdo. Frühauf et al. realizaron un estudio comparativo entre la desvascularización hepática permanente y la hepatectomía total, observando un compromiso renal y hemodinámico mayor y más precoz en los animales que fueron sometidos a desvascularización y concluyen que el modelo anhepático es preferible para el estudio de dispositivos bioartificiales, mientras que el modelo de desvascularización permite un mejor estudio de la IHA secundaria a isquemia³⁰².

La desvascularización transitoria, a diferencia de la anterior, se practica mediante una oclusión temporal de la arteria hepática y de la vía biliar principal una vez realizado el shunt porto-cava. Diferentes periodos de oclusión han sido publicados (tabla 15), dando lugar a diferentes grados de necrosis hepática, pero logrando igualmente el desarrollo de encefalopatía hepática. Tiene la ventaja frente a la desvascularización completa de ser un modelo potencialmente reversible, ya que existe margen para la regeneración hepática.

Referencia	especie	t isquemia	% necrosis
De Groot et al. ³⁰³	cerdo	4 – 6h	40% – 75% *
Fourneau et al. ³⁰⁴	cerdo	6 – 10h	90%**
Benoist et al. ³⁰⁵	cerdo	5,5h	69,3% – 91,5% *

Tabla 15. Modelos porcinos de IHA por desvascularización transitoria.

t isquemia: tiempo de isquemia

*en individuos muertos y supervivientes

** en individuos muertos

2.3.2. Modelos farmacológicos hepatotóxicos

Paracetamol

El paracetamol o acetaminofén es la principal causa de IHA en la mayoría de los países desarrollados y la primera causa por toxicidad farmacológica, seguido por los antirretrovirales y agentes antituberculosos. Por ello, es uno de los modelos que más se ha intentado reproducir a nivel experimental y sus mecanismos patogénicos son bien conocidos.

La sobredosificación de paracetamol satura las vías normales de metabolización, dando lugar a un exceso en la producción de NAPQI por un aumento en el metabolismo mediado por el citocromo P-450. Este subproducto, acabadas las reservas de GSH para su detoxificación mediante conjugación, se une a los grupos sulfhidrilos de la cisteína, formando aductos proteicos.

La formación de aductos proteicos es capaz de estimular el sistema inmunológico y es responsable de la toxicidad hepática mediada por dicho sistema, que junto a la toxicidad directa, constituyen las principales formas de toxicidad hepática de un fármaco.

Inicialmente se pensó que, dada la formación de estos aductos tras el consumo de paracetamol, la toxicidad debida a esta sustancia era secundaria a ellos. Sin embargo, no se ha podido demostrar que ninguno de estos aductos sea una verdadera diana del sistema inmunológico. Por el contrario, se ha objetivado que la unión de NAPQI a proteínas mitocondriales se correlaciona con la toxicidad.

En la mitocondria, los aductos formados provocan la alteración de la cadena respiratoria, aumentando el estrés oxidativo y la producción de peroxinitrito, un potente oxidante. El aumento de este estrés oxidativo provoca la formación del poro de permeabilidad transitoria de la membrana, que altera el potencial de membrana y, consecuentemente, la síntesis de ATP.

Parece ser, no obstante, que debido a la discordancia temporal que existe entre la depleción de GSH y la aparición de la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo inducido directamente por los aductos del paracetamol por sí solo, no es capaz de

2. INTRODUCCIÓN

inducir la formación del poro de permeabilidad transitoria de la membrana mitocondrial y es necesario un segundo evento amplificador para desencadenar la cadena de eventos que, finalmente, conduce a la muerte celular.

Este segundo mecanismo capaz de amplificar el estrés oxidativo mitocondrial es la activación de la cadena de quinasas y fosfatasa relacionadas con la quinasa c-jun-N-terminal (JNK), perteneciente al grupo de las proteinquinas activadas por mitógenos (MAPK), como lo demuestra el bloqueo de Sab, una proteína de la membrana externa mitocondrial que interactúa con JNK y es corresponsable de las acciones de ésta última en la mitocondria, o el uso de inhibidores de JNK, que son capaces de prevenir el daño hepático secundario al paracetamol^{306,307,308}.

Las ratas, en general, son un modelo poco apropiado para el estudio de la toxicidad por paracetamol, ya que, a pesar de producirse aductos de paracetamol, incluso en la mitocondria, y poder sufrir diferentes grados de depleción de GSH, no desarrollan estrés oxidativo mitocondrial ni activan la vía de la JNK, por lo que apenas desarrollan un cuadro de IHA³⁰⁹. En uno de los primeros trabajos publicados, un estudio en ratas Wistar, la necrosis hepática como causa de la muerte sólo se consiguió demostrar en un 10% de los animales tratados³¹⁰.

Una forma artificiosa de potenciar el efecto del paracetamol en éste y otros modelos, dotándolos así de mayor versatilidad, es la adición de inductores del sistema P-450, la depleción de GSH o la combinación de ambos. Otra forma de conseguir estos efectos es mediante la creación de cepas genéticamente modificadas o “*knock-out*”, especialmente utilizada en los modelos murinos.

Los ratones, al contrario que las ratas, poseen mecanismos de toxicidad por paracetamol similares a los humanos, aunque la lesión hepática es mucho más precoz que en seres humanos, como lo indica el pico sérico de ALT, que en los ratones se produce entre las 12h – 24h postintoxicación, mientras que en los seres humanos suele ser entre las 36h – 48h³¹¹.

Miller et al. en 1976 crearon un modelo de IHA en cerdo tras la administración intragástrica de paracetamol, y Gazzard et al. en 1975, Francavilla et al. en 1989 — con inducción del citocromo P-450 con tiopentato de sodio — y Kelly et al. en 1992

2. INTRODUCCIÓN

— con depleción de GSH con butionina sulfoximina —, en perros. Sin embargo, pese a la ventaja teórica del tamaño de estos modelos, la estandarización de la dosis de paracetamol, debido a la alta variabilidad de respuesta al tóxico entre individuos — edad, sexo, etc. — o el establecimiento de la mejor vía de administración no ha sido posible. Además, la necesidad de añadir medidas potenciadoras del efecto mediante la inducción del citocromo P-450 o la depleción de GSH, los hace más complejos y sujetos a más factores de confusión. El desarrollo de metahemoglobinemia, anemia refractaria, así como de lesiones agudas tóxicas en otros órganos, como el corazón, los pulmones o los riñones, limita también su uso^{295,312,313,314,315}.

Todo esto provoca una gran disparidad en los resultados y limita enormemente la reproducibilidad de estos modelos, si bien es cierto que, en el caso del modelo porcino, debido al auge de la terapia celular y de los dispositivos bioartificiales, su desarrollo ha continuado perfeccionándose enormemente en los últimos años, llegando a servir incluso de estudio piloto como paso previo a la realización de un ensayo clínico con un dispositivo de soporte hepático^{316,317,318} y sigue siendo utilizado para el estudio de mecanismos de respuesta inflamatoria y de regeneración hepática.

Tetracloruro de carbono

El tetracloruro de carbono o CCl₄ es un alcano halogenado sintetizado por primera vez en 1839 por el químico francés Henri Victor Regnault. Es líquido a temperatura ambiente e incoloro, y ha tenido muchos usos en la industria: líquido refrigerante, fungicida, desengrasante, solvente de pinturas y como agente extintor, entre otros.

Actualmente, desde un punto de vista comercial, está en desuso por su alta toxicidad medioambiental (anexo 5) y su potencial carcinogénico³¹⁹ (anexo 6), sin embargo, es un compuesto frecuentemente utilizado en el ámbito de la investigación experimental, especialmente como modelo de hepatotoxicidad para el desarrollo de modelos de insuficiencia hepática crónica, es decir, cirrosis, aunque posteriormente ha sido igualmente utilizado y de forma amplia en modelos

2. INTRODUCCIÓN

de IHA y otros procesos hepáticos como la degeneración grasa, la fibrosis, la muerte hepatocelular y la carcinogénesis. Sus principales problemas como modelo de IHA son la dificultad de reproducibilidad y la gran variabilidad entre especies (tabla 16), y la falta de metabolización completa del tóxico a nivel hepático, que puede provocar lesión en otros órganos, especialmente pulmón y riñones (necrosis tubular aguda)^{320,321}.

Especie/cepa	Sexo	Vía	Vehículo	Tiempo	LD ₅₀	Referencia
Ratón						
Swiss Webster	m/h	intraperitoneal	aceite de maíz	24h	4.144/4.463	Klaassen y Plaa, 1967 ³²²
-	-	oral	-	-	12.100-14.400	IARC, 1979 ³²³
Swiss Webster	h	intraperitoneal	aceite de maíz	24h	4.676	Gehring, 1968 ³²⁴
OF1 (SPF)	h	intraperitoneal	aceite de oliva	14d	3.350	Gradiski et al., 1974 ³²⁵
Rata						
Wistar	h	oral	-	14d	2.821	Smyth et al., 1970 ³²⁶
SD	m	intraperitoneal	aceite de maíz	48h	4.463	Klingensmith et al., 1983 ³²⁷
SD	m	intraperitoneal	aceite de maíz	24h	3.029	Klaassen y Plaa, 1969 ³²⁸
SD	h	intraperitoneal	aceite de cacahuete	24h	6.603	Lundberg et al., 1986 ³²⁹
"	"	"	"	14d	2.824	"
CRL:CD(SD) (Charles River)	m	oral	aceite de maíz	14d	10.054	Kennedy et al., 1986 ³³⁰
Perro						
Mestizo	m/h	intraperitoneal	aceite de maíz	24h	2.391	Klaassen y Plaa, 1967 ³³¹

Tabla 16. Estudios de letalidad del CCl₄. LD₅₀ dosis letal 50% (mL/Kg); SD Sprague-Dawley; m macho; h hembra. Modificado del informe sobre CCl₄ de la OMS de 1999³³².

Las sustancias hepatotóxicas pueden clasificarse en aquéllas que requieren activación metabólica y las que no. El CCl₄ pertenece al primer grupo, ya que es

2. INTRODUCCIÓN

metabolizado por isoenzimas del citocromo P-450 — CYP2E1, CYP2B1, CYP2B2 Y CYP3A —, dando lugar al radical triclorometilo ($\text{CCl}_3\cdot$).

Este radical se puede unir a gran cantidad de moléculas intracelulares — ácidos nucleicos, proteínas, lípidos —, alterando muchos procesos celulares, como el metabolismo lipídico, dando lugar a la degeneración grasa del hígado o esteatosis. Otro ejemplo son los aductos formados entre el $\text{CCl}_3\cdot$ y el DNA, que se consideran un mecanismo carcinogénico.

El $\text{CCl}_3\cdot$ puede también reaccionar con el oxígeno, formando el radical triclorometilperóxido ($\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$), una especie de oxígeno enormemente reactiva, capaz de alterar los ácidos grasos poliinsaturados, especialmente aquéllos asociados a los fosfolípidos, en un fenómeno conocido como peroxidación lipídica. Este fenómeno afecta a la integridad de las membranas plasmática, mitocondrial y retículo-endoplásmica, con la consecuente pérdida de la homeostasis celular, además de generar productos de degradación, que son igualmente tóxicos, como aldehídos, capaces de unirse a grupos funcionales de las proteínas impidiendo su acción enzimática.

La intoxicación por CCl_4 también provoca la hipometilación de componentes celulares, como el RNA, cuyo resultado es la inhibición de la síntesis proteica. Es capaz, asimismo, de estimular moléculas como el óxido nítrico (NO), factores de crecimiento transformantes (TGF) o factores de necrosis tumoral (TNF), que inducen procesos de apoptosis y/o fibrosis^{333,334}.

La suma de todos estos procesos, en última instancia, da lugar a la muerte hepatocelular.

Uno de los trabajos más interesantes publicados, precisamente en nuestro mismo modelo, ratas Sprague-Dawley macho, establece una relación dosis-dependiente no sólo de hepatotoxicidad, sino también de regeneración hepática. En este estudio, dosis crecientes de CCl_4 , hasta una dosis límite de 2 mL/Kg, se asociaron con una mayor y precoz división celular, como respuesta regenerativa. A partir de los 2 mL/Kg, esta capacidad de regeneración disminuyó drásticamente, a la vez que aumentaba el daño hepático, provocando una mayor mortalidad³³⁵.

2. INTRODUCCIÓN

Precisamente, la administración repetida de dosis bajas de CCl₄ provoca ciclos repetidos de lesión y regeneración, que dan lugar al modelo de cirrosis, mientras que dosis únicas y altas provocan un cuadro de IHA.

Basados en este estudio del grupo de Mehendale y en otros como el de Taniguchi et al.³³⁶, en ratas Wistar que confirma que es la inducción de determinadas citoquinas y factores de transcripción — donde es crucial NF-kB — la responsable de la regeneración hepática tras la administración de CCl₄, nuestro estudio de dosis comenzó a partir de 2 mL/Kg.

El modelo de CCl₄ en ratones, ratas y cerdos ha sido utilizado además, para el estudio del trasplante de hepatocitos²²⁶. Un estudio muy reciente con éstos últimos demostró un aumento de la supervivencia mediante la arterialización de la vena porta con un dispositivo de asistencia hepática³³⁷ — L.E.O2 NARDO, *Liver Extracorporeal Oxygen NARDO* —, previamente utilizado por este mismo grupo en un modelo de IHA en cerdos, generado por hepatectomía del 85% – 90%³³⁸.

Desde un punto de vista histológico y refiriéndonos a nuestro modelo de ratas Sprague-Dawley en concreto, las lesiones que provoca el CCl₄ en el hígado son visibles con tinción de Hematoxilina-Eosina (HE) a partir de las 6h tras la administración del tóxico y aunque pueda haber variaciones temporales, los hallazgos y su localización son similares a los encontrados por la toxicidad secundaria al paracetamol.

Estas lesiones comienzan por una fina vacuolización del citoplasma de los hepatocitos de la zona 3 perivenular (Figura 8), seguida de una infiltración polimorfonuclear de la pared de la vena central y de los hepatocitos que la rodean. Progresivamente, el infiltrado polimorfonuclear va expandiéndose desde la vena central hacia los sinusoides hepáticos, que se mantienen inicialmente íntegros y sin signos de obstrucción vascular. Las áreas periportales no se ven afectadas habitualmente de forma significativa.

Posteriormente y a medida que aumenta el infiltrado inflamatorio, aparecen células balonizadas, macrovacuolas, alteraciones nucleares evidentes y focos de necrosis en zona 3 que aumentan hasta las 48h postintoxicación, con escasas

2. INTRODUCCIÓN

figuras mitóticas en la periferia. La necrosis, que puede llegar a ser extensa con formación de puentes y desestructuración de los cordones y sinusoides hepáticos, va siendo aclarada por los histiocitos que sustituyen a los polimorfonucleares y el número de mitosis aumenta, reflejando una mayor actividad regeneradora.

A partir del quinto día, la arquitectura hepática es prácticamente normal con apenas algún histiocito infiltrando la pared de la vena centrolobulillar y partir del séptimo día, totalmente indistinguible del hígado normal.

A nivel histoquímico, es decir, actividad enzimática y metabólica en cada zona del lobulillo hepático, las alteraciones más relevantes son los cambios en la actividad de la fosfatasa alcalina y las variaciones en el almacenamiento de glucógeno y lípidos, observados mediante microscopía electrónica.

El cambio más precoz es una disminución de la fosfatasa alcalina alrededor de la vena central a las 2h de la administración del CCl₄. A partir de las 8h aproximadamente, la tendencia se invierte y la presencia de este enzima aumenta enormemente, especialmente en zonas periféricas, donde se producen de manera más intensa los fenómenos de regeneración. Desde las 48h en adelante, los niveles de fosfatasa alcalina disminuyen progresivamente hasta normalizarse.

La ALT y la AST son detectables en sangre periférica como resultado de la intensa citolisis y su actividad a nivel tisular es inversamente proporcional. Existe también una disminución en la síntesis de factores de la coagulación, evidenciada por un aumento del TTPa a las 6h y del TP a partir de las 16h³³⁹.

De forma también temprana, existe una clara delimitación de las zonas en las que se distribuye el glucógeno intracelular, predominando en las zonas periféricas (periportales) del lobulillo hepático. A partir del tercer día, la distribución sigue ya un patrón normal. En cuanto a la infiltración grasa o esteatosis hepática, su distribución afecta a todas las zonas del lobulillo hepático, siendo más intensa en las zonas perivenulares, y normalizándose, al igual que los depósitos de glucógeno, a partir de las 72h.

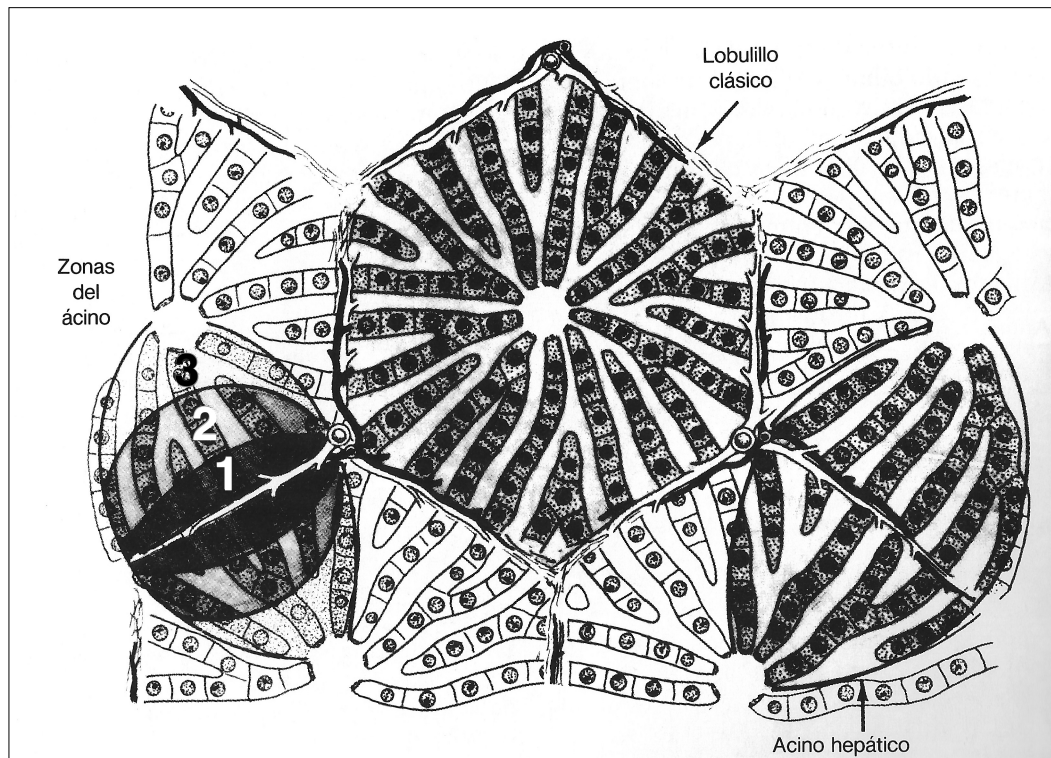


Figura 8. Representación esquemática del lobulillo poligonal clásico y del acino elipsoidal hepáticos. Los números 1, 2 y 3 representan zonas que indican la posición relativa de las células en el acino con respecto a un gradiente de concentración de oxígeno de la sangre que fluye desde las ramas de la arteria hepática y de la vena porta. Modificado de D.W. Fawcett, Tratado de Histología, 12ª edición; McGraw-Hill 1995³⁴⁰

Galactosamina

La galactosamina es un 6-carbono-amino-azúcar derivado de la galactosa, que en condiciones fisiológicas forma parte de algunas hormonas glicoproteicas, como la hormona estimulante de los folículos (FSH) o la hormona luteinizante (LH) y de algunos mucopolisacáridos. Esta sustancia es metabolizada a nivel hepático por la vía de la galactosa, dando lugar a la producción de hexosaminas que contienen uridina difosfato (UDP), como UDP-glucosamina, UDP-N-acetilgalactosamina o UDP-N-acetilglucosamina, moléculas capaces de inhibir la síntesis de RNA, impidiendo la transcripción genética y la síntesis proteica, ocasionando en última instancia una necrosis hepática masiva y difusa³⁴¹.

Este tóxico remeda una gran pléyade de rasgos clínicos característicos de la IHA, como la insuficiencia renal, la encefalopatía hepática e hipertensión intracraneal³⁴²

2. INTRODUCCIÓN

con hiperamoniemia, alteraciones de la coagulación y del metabolismo, como la hipoglucemia, etc³⁴¹.

Ha sido utilizado tanto en ratas, por Keppler et al. por primera vez en 1968³⁴³, como en conejos³⁴⁴, perros^{345,346} y cerdos¹³⁶, permitiendo la evaluación de dispositivos bioartificiales^{136,347,348}, así como del potencial uso terapéutico del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), en un modelo en el que la galactosamina se combina con la administración de lipopolisacárido³⁴⁹.

Otros logros reseñables conseguidos con el modelo de IHA y galactosamina han sido, por ejemplo la identificación de combinaciones de concentraciones plasmáticas de sustancias que, además de actuar como marcadores de IHA, pueden tener valor como marcadores pronósticos precoces, como la combinación de las concentraciones de ácido 5-hidroindolacético, glucosa, fosfato y β -hidroxibutirato³⁵⁰ o la confirmación del papel de JNK como intermediario en el mecanismo de lesión hepática y el posible uso de inhibidores específicos como posible tratamiento³⁵¹.

Sin embargo, al igual que sucede en los modelos de toxicidad por paracetamol y CCl_4 , la reproducibilidad es limitada, en este caso por la alta variabilidad del tiempo desde la inducción del daño hepático hasta la muerte. Además, su uso es caro en animales grandes y entraña grandes riesgos en su manipulación para el personal^{295,352}.

Tioacetamida

La tioacetamida es un compuesto organosulfurado ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NS}$), altamente hepatotóxico cuando es metabolizado a sulfóxido y disulfóxido de tioacetamida por las monooxigenasas microsómicas dependientes del dinucleótido flavina-adenina, produciendo estrés oxidativo, peroxidación lipídica, formación de aductos proteicos, daños en las membranas celulares, e interfiriendo con la movilidad del RNA del núcleo al citoplasma³⁵³.

2. INTRODUCCIÓN

En muchos aspectos es similar al CCl_4 , ya que los mecanismos de toxicidad celular son parecidos; histológicamente produce una lesión en la región centrolobulillar del acino hepático por necrosis hepatocitaria y se comporta también de manera dual, estimulando la regeneración hepática por debajo de una dosis umbral, que en este caso es de 600 mg/Kg en ratas Sprague-Dawley macho³⁵⁴. Este modelo ha sido también utilizado para el estudio del trasplante de hepatocitos, en ratas Lewis³⁵⁵, y para el estudio del posible efecto hepatoprotector de multitud de sustancias^{356,357,358}.

Tiene la ventaja frente a otros tóxicos de ser metabolizada de manera altamente específica en el hígado, no produciendo por tanto, daños en otros órganos³⁵⁹, a excepción del sistema nervioso central, donde parece que tanto la tioacetamida como sus metabolitos pueden tener un efecto neurotóxico, agravando el cuadro de encefalopatía y no siendo, por tanto, un modelo óptimo para su estudio²⁹⁵.

2.3.3. Modelos infectivos

Víricos

Los virus hepatotropos humanos, especialmente los virus de la hepatitis A, B y C, son una de las principales causas de IHA a nivel mundial. A pesar de ello, el uso de virus para el desarrollo de modelos experimentales de IHA ha tenido poco éxito y cabe destacar únicamente dos: el virus de la hepatitis murina A 59 (MHV-A59) y el virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV).

El MHV-A59 es un coronavirus capaz de producir un cuadro de IHA con una mortalidad a las 48h de hasta del 80%³⁶⁰, sin embargo, este virus posee un tropismo dual, dependiendo de la vía de inoculación y de la cantidad de virus administrada, pudiendo afectar también al sistema nervioso central en forma de meningoencefalitis y desmielinización crónica³⁶¹.

El modelo de IHA con RHDV fue descrito por Tuñón et al. en 2003³⁶², tras la inyección intramuscular de este calicivirus en conejos. Este modelo recrea de una forma muy fiel el cuadro clínico humano, incluyendo el desarrollo de

hipertransaminasemia e hiperbilirrubinemia, hipoglucemia, coagulopatía e hiperamoniemia con hipertensión intracraneal y coma encefalopático, así como la lesión histológica, con áreas de hemorragia y necrosis hepática con infiltrados inflamatorios³⁵². El principal problema de este modelo es su limitación al conejo como especie, ya que no afecta a otros vertebrados³⁶³.

Bacterianos (*lipopolisacárido*)

El lipopolisacárido (LPS), un componente estructural esencial de la membrana de las bacterias gram negativas, se encuentra en gran cantidad en el tubo digestivo. En situaciones especiales — trauma y quemaduras severas, enfermedades hepáticas, isquemia intestinal, etc. — existe una proliferación de bacterias gram negativas intestinales y un aumento la permeabilidad de la barrera gastrointestinal, favoreciendo el paso del LPS al flujo portal y el torrente sanguíneo, produciendo cuadros de endotoxemia.

Este fenómeno se ha observado en diversos modelos de enfermedades hepáticas y se ha comprobado que la colectomía, que reduce la carga bacteriana, mejora el cuadro de insuficiencia hepática. Nace de estas observaciones el interés por el estudio de los efectos del LPS sobre el hígado.

Muchos estudios han confirmado que el LPS es capaz de inducir un daño hepático por medio de dos mecanismos: uno directo por alteración de las membranas mitocondriales de los hepatocitos y uno indirecto, mediante la activación de las células de Kupffer. Las células de Kupffer activadas liberan TNF- α , interleuquinas, leucotrieno B4 y complemento C5, que atraen a los neutrófilos. Éstos a su vez, liberan especies reactivas de oxígeno que producen la peroxidación lipídica de los hepatocitos. Además, las células de Kupffer liberan otras sustancias que potencian la lesión hepática³⁶⁴.

Así pues, se han desarrollado modelos de insuficiencia hepática aguda basados en la administración de LPS, generalmente de forma concomitante a otras sustancias como la galactosamina o junto a la inoculación de bacterias.

2. INTRODUCCIÓN

El trabajo de Zhang et al.³⁶⁵ es muy interesante, ya que no sólo desarrollan un modelo de IHA en ratones mediante la inoculación de *Propionibacterium acnes* y LPS, sino que además realizan un brazo de tratamiento con células madre mesenquimales, demostrando una mayor supervivencia y un menor grado de lesión hepática en el grupo de ratones tratados con MSCs, a través de un mecanismo inmunorregulador caracterizado por la activación de células dendríticas por medio de las MSCs.

Modelo	Especie						HIC	Rp	Rv	H
	Cerdo	Perro	Conejo	Rata	Ratón	HE				
Paracetamol	✓	✓	✓			✓	✓	+/-	✓	
CCl ₄	✓		✓	✓	✓	✓		+/-	✓	
Galactosamina	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	+/-	✓	
Tioacetamida			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Virus			✓		✓	✓	✓	✓	✓	
Hepatectomía total/parcial	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Desvascularización completa/transitoria	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓		

Tabla 17. Resumen de modelos experimentales. **HE**, Encefalopatía hepática; **HIC**, Hipertensión intracraneal; **Rp**, Reproducibilidad; **Rv**, Reversibilidad; **H**, Hazzard (peligro).
Modificado de Bélanger et al.²⁹⁵, 2005.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis de trabajo

Hipótesis conceptual

El uso de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, merced a sus efectos inmunomodulador y antiinflamatorio, es un tratamiento eficaz de la insuficiencia hepática aguda inducida en nuestro modelo experimental.

Hipótesis nula

El uso alogénico de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, en nuestro modelo experimental de insuficiencia hepática aguda inducida, no tiene impacto sobre la mortalidad ni sobre la función hepática y, por tanto, no modifica la historia natural de la enfermedad.

Hipótesis operativa

Las hipótesis operativas son:

1. El trasplante alogénico, por vía venosa periférica, de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en ratas Sprague-Dawley con insuficiencia hepática aguda inducida con CCL₄, aumenta la supervivencia en los animales tratados.
2. El trasplante alogénico, por vía venosa periférica, de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en ratas Sprague-Dawley con insuficiencia hepática aguda inducida con CCL₄, disminuye el grado de necrosis hepática y mejora la función hepática presentando una menor elevación de los niveles plasmáticos de AST, ALT, FA y B_T.

Hipótesis estadística

Las hipótesis estadísticas son:

1. El trasplante alogénico, por vía venosa periférica, de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en ratas Sprague-Dawley con insuficiencia hepática aguda inducida con CCL₄, disminuye de forma estadísticamente significativa la mortalidad respecto a las ratas no trasplantadas con $P < 0,05$.
2. El trasplante alogénico, por vía venosa periférica, de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en ratas Sprague-Dawley con insuficiencia hepática aguda inducida con CCL₄, disminuye de forma estadísticamente significativa los niveles plasmáticos de AST, ALT, FA y B_T respecto a las ratas no trasplantadas con $P < 0,05$.

3.2. Objetivos

Objetivo del proyecto

Realizar un estudio experimental sobre la potencial aplicabilidad de la terapia celular en el tratamiento de la insuficiencia hepática aguda.

Objetivo principal

El objetivo principal del estudio es realizar un análisis de la supervivencia, comparando la mortalidad presentada por el grupo de ratas al que se le induce fallo hepático agudo y es tratado con terapia celular frente al grupo con fallo hepático no tratado.

Objetivo secundario

Los objetivos secundarios son:

1. Realizar un estudio de dosis, para determinar la cantidad de CCl_4 necesaria para obtener un modelo de IHA en nuestro laboratorio y que será administrada, posteriormente, en el estudio de supervivencia.
2. Realizar un estudio comparativo de las alteraciones bioquímicas producidas por el tóxico.
3. Realizar un examen histológico comparativo de los hígados de las ratas tratadas con ASCs y de las no tratadas, tras la inducción de IHA, para evaluar el grado de lesión histológica obtenido.
4. Realizar un estudio del reclutamiento celular, analizando la presencia o ausencia de ASCs en el parénquima hepático y su distribución.
5. Realizar un recuento celular en hígado, pulmón y bazo, para determinar la "ruta celular".

3.3. Relevancia del proyecto

En la actualidad, no existe ningún tratamiento, a excepción del trasplante hepático, con una eficacia clínicamente relevante en el tratamiento de la insuficiencia hepática aguda. Los diferentes dispositivos disponibles ya en el mercado, o aquéllos que aún se encuentran en fases de ensayo clínico, ofrecen únicamente un puente al trasplante hepático, ganando tiempo hasta la aparición de un donante adecuado.

Estos dispositivos son caros y requieren de una formación altamente cualificada para su utilización. La posibilidad de contar con una nueva terapia, que se administre de forma sencilla y segura, minimizando la invasividad al paciente y que garantizando unos resultados, en términos de eficacia, al menos iguales y no

inferiores a las terapias ya existentes, y a un coste razonable, supondría un avance en el campo de la Medicina de Cuidados Intensivos, con un alto impacto clínico y económico. Este impacto sería sin duda mayor, si la terapia celular consiguiera demostrar un beneficio incluso superior, aumentando la supervivencia y disminuyendo la necesidad del TOH, hecho lejos aún de ser demostrado, pero que justifica la necesidad de continuar trabajando en esta línea de investigación.

3.4. Limitaciones del estudio

La limitación principal del estudio es la falta de análisis de parámetros de la coagulación. Ello es debido a que los autoanalizadores de los que disponemos para los estudios sanguíneos han sido diseñados para su uso en seres humanos y, por tanto, el volumen mínimo necesario para poder realizar análisis de factores y tiempos de la coagulación es de 2 mL. Este volumen es demasiado grande para extraer de una sola vez a los animales de nuestro estudio — ratas macho Sprague-Dawley con peso < 373 g —, ya que representa un porcentaje alto de su volemia y necesitamos otra muestra de 1 mL para el estudio enzimático y bioquímico, siendo recomendación de nuestra veterinaria no realizar dichas determinaciones analíticas, no siendo imprescindibles, para el bienestar de los animales.

Las alteraciones de la coagulación son una manifestación clínica importante en la fisiopatología de la IHA en los seres humanos y se manifiesta de manera muy precoz en estos animales, incluso antes de que se puedan evidenciar cambios a nivel histológico³³⁹, siendo un buen marcador de insuficiencia, al contrario que los enzimas hepáticos clásicos. A pesar de esto, y siendo posible la realización del estudio de parámetros de la coagulación en ratas SD, prácticamente ningún grupo de investigación realiza dichas determinaciones.

Otra limitación fue la restricción del estudio enzimático a los enzimas hepáticos clásicos — AST, ALT y FA —, ya que estudios previos demuestran que existen otros enzimas, especialmente los relacionados con los mecanismos de estrés oxidativo y utilización de antioxidantes como el glutatión, que tienen una mayor y mejor correlación con la disfunción hepática mediada por toxicidad^{366,367}. Sin embargo,

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

estas determinaciones son poco frecuentes o inexistentes en seres humanos en la práctica clínica habitual y no disponemos de manera rutinaria de los reactivos necesarios para su análisis.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Animales, técnicas y material utilizados

El uso de los animales de este estudio se realizó conforme a los principios y guías de práctica ética para la investigación con animales de laboratorio, conforme a:

1. **Real Decreto 53/2013**, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia (BOE, 08/02/2013).
2. **Guidelines for the Euthanasia of Animals**, *American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM*, edition 2013).
3. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals** (8th edition). *Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies, National Research Council of the National Academies*.
4. **Otras fuentes consultadas:** *American Veterinary Medical Association (AVMA)*, *NIH Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW)*, *NIH Office of Animal Care and Use (OACU)*, *The Principles of Human Experimental Techniques (Russell y Burch, 1959)*.

Animales

Los animales utilizados fueron machos de rata Sprague-Dawley, cepa exogámica OFA (*Oncins France Strain A, Charles-River® Breeding Laboratories*), de 8 semanas de edad con pesos comprendidos entre 250 g y 300 g.

A su llegada al animalario del Centro de Investigaciones, los animales fueron agrupados en grupos de 5 y colocados en cajas transparentes de policarbonato con techo de rejilla de acero inoxidable y base de virutas de madera (figura 9A). Se les suministró pienso para ratas estándar y agua *ad libitum* y fueron ubicadas en una habitación con ambiente controlado durante una semana, como período de aclimatación. La temperatura, humedad relativa y ciclos de luz/oscuridad de la habitación fueron 20°C – 26°C, 40% – 70% y 12h/12h, respectivamente.

Al finalizar el período de aclimatación y comenzar con el ensayo, el rango de pesos final fue de 231 g a 373 g.

Obtención y cultivo de ASCs

Después de la inducción anestésica, que se explica más adelante, se coloca al animal sobre una manta incubadora con fuente de calor y se continúa con el procedimiento anestésico hasta que se confirma, mediante ausencia de respuesta a la presión en la planta de la extremidad inferior, que está completamente anestesiado.

Una vez anestesiado, se extrae el tejido adiposo subdérmico, procedente principalmente de las regiones axilares e inguinales del animal. El tejido adiposo aislado se lava con tampón salino y es disgregado físicamente en fragmentos pequeños. Posteriormente, estos fragmentos son sometidos a digestión enzimática, durante 30 minutos, con colagenasa de tipo I a una concentración final de 0,075% y aplicar agitación rotacional a una temperatura ambiental de 37°C. Transcurridos los 30 minutos, se neutraliza la reacción enzimática añadiendo suero fetal bovino (1/10 del volumen de la suspensión de fragmentos adiposos digeridos).

Una vez realizada la digestión enzimática y con el objetivo de separar las células individualizadas del resto de los componentes del tejido, la muestra se centrifuga a 300 g durante 10 minutos a temperatura ambiente y el agregado celular es resuspendido en medio de cultivo celular — DMEM, 10% suero fetal bovino, 2 mM Glutamina, 1% antibiótico (estreptomicina 10 µg/ml / penicilina 1 UI/ml) —, y filtrado a través de una malla de 40 micras de diámetro de poro.

Obtenida la suspensión de células individualizadas, se procede al recuento de las células viables, según el método de exclusión por tinción con azul tripán.

Una vez conocida la cantidad de células conseguidas del tejido adiposo subcutáneo de partida, las células se siembran a razón de 20.000-30.000 células por centímetro cuadrado (céls/cm²) de superficie en los recipientes de cultivo celular (figura 10) y se trasladan a incubadoras que proporcionan las condiciones

4. MATERIAL Y MÉTODOS

adecuadas para el cultivo celular —temperatura de 37°C, 5% de CO₂ y 90-95% de humedad relativa—.

Transcurridas aproximadamente 24 horas desde el inicio del cultivo, las células no adheridas y las partículas flotantes son retiradas mediante la aspiración del medio de cultivo y el lavado con tampón fosfato salino. Después del lavado, se añade de nuevo medio de cultivo, que se cambia cada 3 ó 4 días mientras las células se dividen y crecen.

Una vez alcanzado el 90% de confluencia de las células en el recipiente de cultivo, las células deben repartirse en nuevos recipientes para impedir la inhibición por contacto y facilitar que prosiga la multiplicación celular hasta alcanzar la cantidad de células deseada. Para ello, las células se despegan del fondo del medio de cultivo con tripsina/EDTA, previo lavado con tampón fosfato salino. La tripsina/EDTA debe añadirse en la cantidad mínima suficiente para cubrir el cultivo celular e incubarse a 37°C durante el tiempo mínimo necesario para que las células se despeguen. Para neutralizar la acción de la tripsina/EDTA, las células se recogen añadiendo un volumen igual de medio de cultivo y la suspensión celular se centrifuga a temperatura ambiente durante 10 minutos a 300 g. Las células obtenidas se recuentan y se cultivan sucesivamente a razón de 5000 céls/cm² hasta obtener la cantidad de células necesarias.

Durante el proceso de expansión celular, algunas de las células se criopreservan en una solución de suero fetal bovino con dimetilsulfóxido al 10% y se almacenan en nitrógeno líquido, tras 24h en una rampa de congelación con isopropanol, hasta su futura utilización.

En nuestro trabajo utilizamos una sola rata de la misma cepa (Sprague-Dawley macho, OFA [*Oncins France Strain A, Charles-River® Breeding Laboratories*]) para la obtención de las células madre mesenquimales a partir de su tejido adiposo y se congelaron en pase 4 – 5, descongelándose una semana antes de su inyección, por lo que todas las células utilizadas en el estudio fueron en pase 5.

Caracterización de las ASCs

Los cultivos celulares se analizan mediante citometría de flujo con BD FACSCalibur™ (*Becton Dickinson Biosciences, Becton, Dickinson and Company, San José, California, EE.UU.*) (figura 11) una vez marcados con anticuerpos monoclonales conjugados con el fluorocromo Alexa Fluor® 647 (*AbD Serotec®, Kidlington, Oxford, Reino Unido*).

Los anticuerpos utilizados son: anti-CD90, anti-CD45 y antiCD11b (*Becton Dickinson Biosciences, Becton, Dickinson and Company, San José, California, EE.UU.*) y anti-CD29 (*Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania*).

Una vez incubadas 2×10^5 células a 4°C, durante 20 minutos con cada anticuerpo y lavadas con PBS, se realiza la citometría y se analiza con el software BD CellQuest™ Pro (*Becton Dickinson Biosciences, Becton, Dickinson and Company, San José, California, EE.UU.*), figura 12.

Los cultivos de células con fenotipo típicamente mesenquimal deben tener una expresión $\geq 95\%$ de CD29 y CD90 y tener una expresión $\leq 5\%$ de CD11b y CD45.

Inyección intraperitoneal de CCl₄

Utilizamos una solución tetracloruro de carbono (*Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA*) diluido en aceite de oliva virgen, que dada la afinidad lipídica del CCl₄ permite una mayor solubilización del tóxico.

Las dosis utilizadas fueron de 2, 3, 4 y 5 mL/Kg de peso a una concentración del 20% y de 5 mL/Kg al 25% en el estudio de dosis y de 5 mL/Kg al 25% en el estudio de supervivencia con ASCs.

Se carga la solución preparada en una jeringa de 2 mL y se punciona con una aguja 21G en la fosa iliaca derecha de la rata, realizando una inyección lenta pero continua (figura 9B). Previo a la punción, es necesario colocar al animal en una ligera posición de Trendelenburg para desplazar los órganos abdominales,

especialmente el paquete intestinal, en dirección cefálica y así evitar la perforación de los mismos durante la maniobra de punción.

En algunos casos, dado el estado de excitación de los animales, fue necesaria una leve sedación con Sevoflurano (*Sevorane®*, Abbott Labs. Ltd., Inglaterra) al 3% y O₂ a 1,5 L/min.

Anestesia

La anestesia de los especímenes se realizó mediante inhalación espontánea de una mezcla de Sevoflurano (*Sevorane®*, Abbott Labs. Ltd., Inglaterra) y oxígeno con un respirador (Figura 9C).

La fase de inducción anestésica se realizó con un flujo de O₂ de 1,5 L/min y una fracción de Sevoflurano inspirado del 8% en una caja de polimetacrilato de metilo transparente con tapa deslizante y toma lateral para la conexión del respirador (Figura 9D), mientras que el mantenimiento se realizó con una mezcla de Sevoflurano al 3% en una manta térmica con la boquilla del respirador acoplada a las fosas nasales de la rata, a modo de mascarilla.

Extracción de sangre

La extracción sanguínea se realizó bajo la técnica anestésica descrita. Una vez colocada la rata sobre una manta térmica, para evitar la hipotermia y la vasoconstricción periférica secundaria, se canaliza una vena lateral de la cola, que es par y discurre por ambos lados de la misma, con un Abbocath®-T 24G (*Venisystems™*, Abbott Ireland) y una jeringa de 1 mL.

Una vez extraído 1 mL de sangre, se inyecta 1 mL de suero salino fisiológico para la reposición de la volemia del animal. La sangre extraída es trasvasada a un recipiente Eppendorf permitiendo la formación de coágulo a temperatura ambiente y obteniendo el suero tras su centrifugación para analizar.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

El análisis de las muestras de suero se realizó en autoanalizadores Beckman Coulter AU 5420 de los laboratorios centrales del Hospital Universitario La Paz.

Los rangos de valores considerados normales y utilizados en nuestro estudio para cada uno de los parámetros analizados son los obtenidos y publicados por Goñi et al.³⁶⁸ y se muestran en la tabla 18.

	Valor mínimo (UI/L)	Valor máximo (UI/L)
AST	65,8	266,2
ALT	26,3	68,5
FA	150,5	412,3
B_T	0,01	0,17

Tabla 18. Rango de valores normales de AST, ALT, FA y B_T para ratas SD macho de 5 – 8 semanas de edad. Modificado de Goñi et al., 2011³⁶⁸.

Inyección intravenosa de ASCs

Se extraen 1×10^6 de células para cada rata de los medios de cultivo y se suspenden en 1 mL de suero salino fisiológico en tubos Eppendorf, realizando varios pases de pipeta para resuspender las células antes de cargarlas en jeringas de 1 mL. Una vez cargadas las jeringas, aplicando la misma técnica anestésica empleada en las extracciones sanguíneas, se extrae 1 mL de sangre de cada animal, que se analiza, y seguidamente se inyectan las células a través de la vena lateral de la cola, en el sistema venoso periférico.

La inyección de las células madre se realiza 30 minutos después de haber realizado la inyección intraperitoneal de CCL₄.

Sacrificio

Los animales fueron sacrificados siguiendo las guías de práctica de eutanasia de la AVMA — *American Veterinary Medical Association* —, edición de 2013, mediante inyección intracardiaca de 1 mL de cloruro potásico 1 molar, bajo anestesia general³⁶⁹.

Los cadáveres fueron posteriormente tratados según el protocolo de manipulación de residuos biológicos del laboratorio de investigación en cirugía experimental.

Histología e inmunohistoquímica

Una vez sacrificados los animales, se rasura el abdomen con una rasuradora eléctrica y se realiza la extracción de los órganos, mediante laparotomía media xifopubiana (figura 9E); hígado en todos los grupos e hígado, pulmón y bazo en los grupos a los que se les administra ASCs.

Posteriormente, se fijan los órganos en bloques mediante inclusión en parafina, para poder realizar cortes con el vibrotomo y montarlos en portaobjetos para su estudio bajo microscopía óptica convencional y de fluorescencia.

El estudio histológico para la evaluación del daño hepático se realizó mediante tinción con Hematoxilina-Eosina (HE) en todos los grupos. Se describen las lesiones halladas, su localización y se clasifican según la severidad mediante una escala propia en cuatro grados.

Para la elaboración de esta escala, aplicamos el método semicuantitativo descrito por Ramaiah et al.³⁷⁰ y adaptado por Blain et al.³⁷¹ (tabla 19) a una muestra aleatoria de 5 cortes histológicos de hígado de cada rata, puntuando 25 campos por corte y aplicando la media a cada corte y posteriormente a cada rata, utilizando un campo de magnificación de 10x aumentos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Score	Descripción
0	No necrosis
+1	Necrosis mínima; células necróticas ocasionalmente en cualquier campo
+2	Menos de 1/3 del campo afectado
+3	Necrosis moderada, con afectación entre 1/3 y 2/3 del campo
+4	Necrosis severa, con más de 2/3 del campo afectado

Tabla 19. Sistema de puntuación de la necrosis hepática, en función de su extensión en relación al campo del microscopio. Modificado de Blain et al., 1999³⁷¹.

Una vez calculada la puntuación media, si ésta se sitúa entre 0 y 1 clasificamos la necrosis como grado I, entre 1 y 2 como grado II, entre 2 y 3 como grado III y por encima de 3 como grado IV. De manera que la descripción de cada grado de necrosis sería:

- Grado I: pequeños focos de citolisis e infiltrado inflamatorio con necrosis hepatocitaria aislada.
- Grado II: moderado infiltrado inflamatorio con necrosis hepatocitaria evidente, asociada a leve esteatosis microvacuolar y presencia de escasas células balonizadas.
- Grado III: intenso infiltrado inflamatorio con gran necrosis hepatocitaria, asociada a marcada esteatosis microvacuolar y presencia de abundantes células balonizadas.
- Grado IV: a los hallazgos descritos en el grado III, se añade marcada necrosis hepatocitaria confluyente con necrosis en puentes.

En los grupos a los que se les administra ASCs se realiza, además del estudio con HE, un estudio de inmunofluorescencia para localizar las ASCs en el parénquima de los órganos diana. Para realizar dicho estudio, previamente a su inyección, la membrana celular de las ASCs se marca con PKH26 (*Sigma-Aldrich®*, *St. Louis, USA*). Una vez inyectadas las células y extraídos los órganos a estudiar, los cortes histológicos obtenidos se tiñen con DAPI (*Sigma-Aldrich®*, *St. Louis, USA*) para marcar los núcleos celulares.

PKH26 es un marcador fluorescente que posee en su estructura largas cadenas alifáticas, que facilitan su incorporación estable a las regiones lipídicas de la

4. MATERIAL Y MÉTODOS

membrana celular. El vehículo proporcionado en el kit comercial — “Diluent C” —, diseñado para mantener la viabilidad celular y maximizar la solubilidad y eficiencia del marcador, es una solución acuosa isoosmótica con las células de mamíferos, que no contiene detergentes, disolventes orgánicos, sales fisiológicas o tampones. El espectro de excitación y de emisión es de 551 nm y 567 nm, respectivamente.

Esta técnica de marcado no es una reacción de saturación, sino que es una función de la concentración del marcador y de la concentración celular, por lo que es esencial disminuir al máximo la cantidad de marcador. Un exceso de éste, produce disminución de la integridad de la membrana celular y por tanto menor viabilidad de las células. El protocolo de tinción con PKH26 se detalla en el apartado de Anexos (anexo 7).

DAPI ó 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro es un marcador fluorescente, capaz de atravesar la membrana celular, que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina del ácido desoxirribonucleico de doble cadena (dsDNA) preferentemente, por lo que es utilizado ampliamente en la microscopía de fluorescencia para teñir los núcleos tanto de células como de células fijadas. Unido al dsDNA, su máximo de absorción o excitación es de 358 nm — ultravioleta — y su máximo de emisión o fluorescencia a 461 nm — azul —. El protocolo de tinción con DAPI se detalla en el apartado de Anexos (anexo 8).

El estudio de lesión histológica en HE se realizó con microscopio óptico Zeiss Axio Lab.A1 (figura 13A) y objetivos A-Plan de 10X, 20X y 40X aumentos, cámara Axio Cam ERc5s y software ZEN 2012 (blue edition), (*Carl Zeiss Microscopy® GmbH, Oberkochen, Alemania*), mientras que el estudio de recuento y distribución celular se realizó con microscopía de fluorescencia: microscopio Leica DMI 6000B (figura 13B), cámara Leica DFC 350 FX R2, caja de control Leica CTR 6000 y software LAS AF Versión 1.5.1., (*Leica Microsystems® GmbH, Wetzlar, Alemania*).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

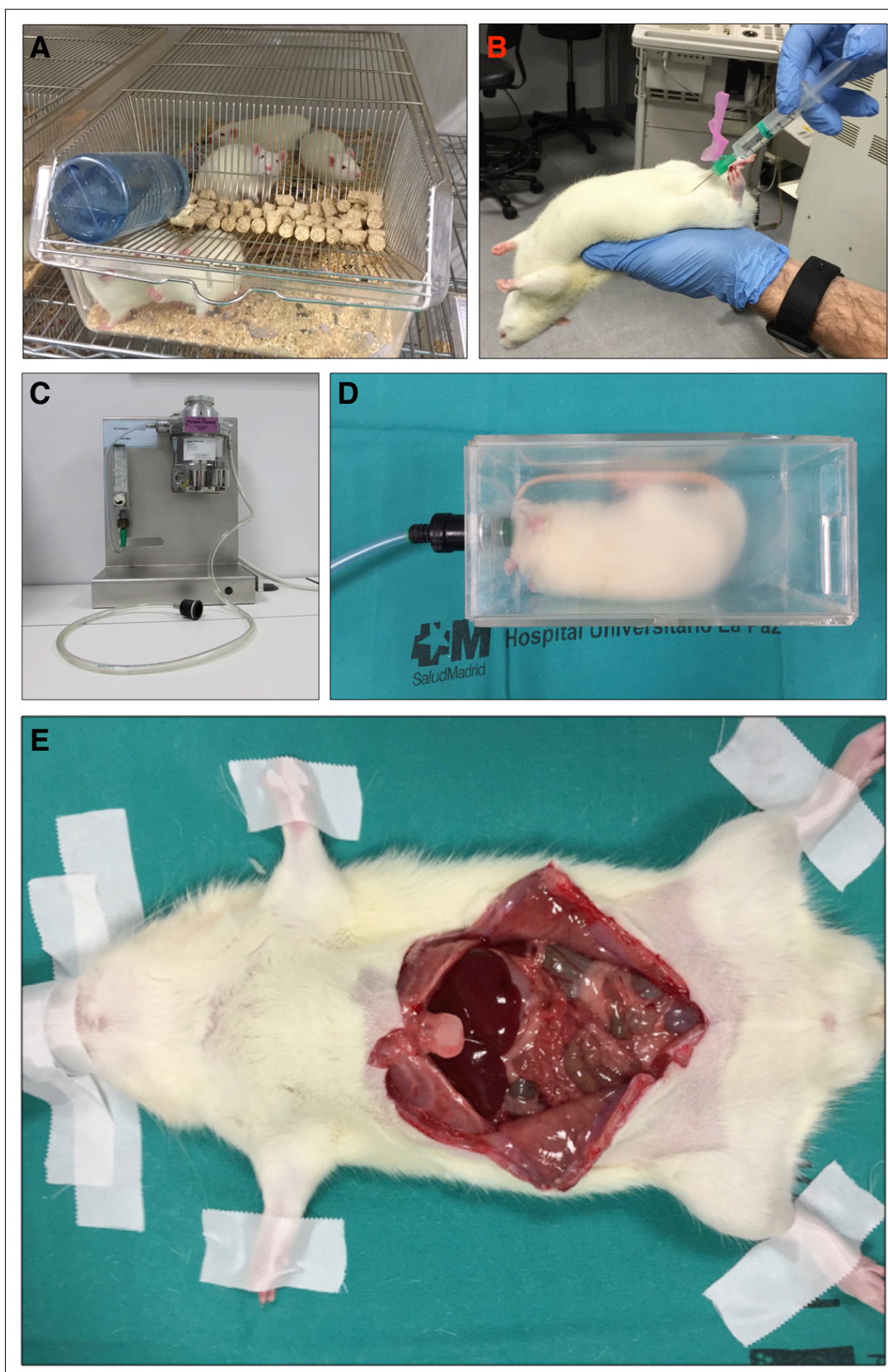


Figura 9. **A** Caja de policarbonato con pienso y agua *ad libitum*. **B** Punción intraperitoneal de CCl₄. **C** Respirador de anestesia. **D** Inducción anestésica. **E** Laparotomía media y exposición de órganos abdominales.

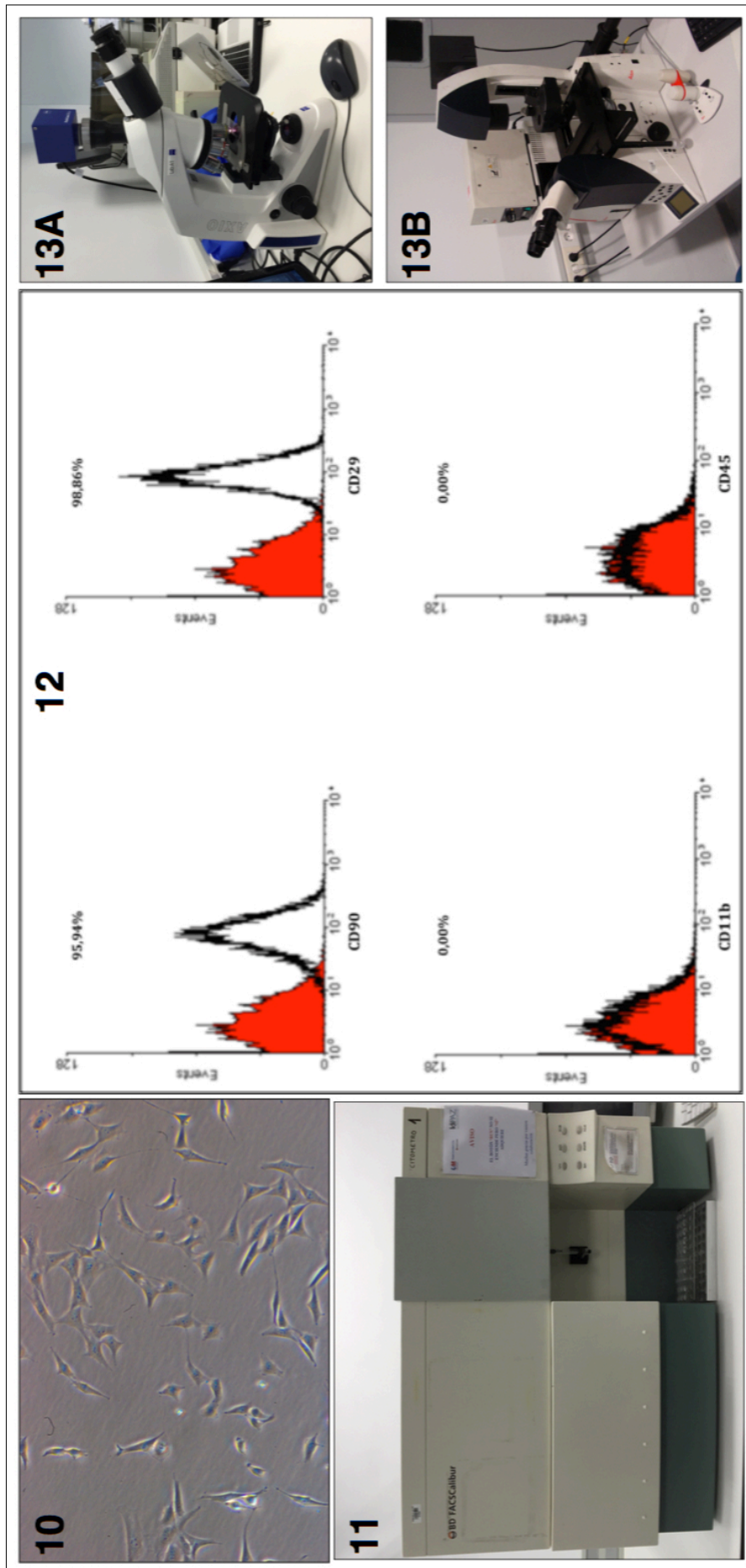


Figura 10. Cultivo de ASCs a las 48h. **Figura 11** Citómetro de flujo BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson Biosciences, Becton, Dickinson and Company, San José, California, EE.UU.). **Figura 12.** Caracterización fenotípica de ASCs de ratas Sprague-Dawley por citometría de flujo, en pase 4. **Figura 13A.** Microscopio óptico Zeiss Axio Lab.A1 (Carl Zeiss Microscopy@ GmbH, Oberkochen, Alemania). **Figura 13B.** Microscopio de fluorescencia Leica DMI 6000B (Leica Microsystems@ GmbH, Wetzlar, Alemania).

4.2. Diseño experimental

El diseño del estudio se hizo teniendo en cuenta las tres “R” de Russell y Burch³⁷² sobre experimentación animal, descritas ya en 1959, los seis criterios que, según Terblanche y Hickman³²¹, todo modelo experimental animal de IHA debe cumplir y los criterios publicados en 2004, ya en la era de los dispositivos bioartificiales, por van de Kerkhove et al²⁸⁸.

Las tres “R” de Russell y Burch son:

1. Reemplazo: utilizar otro método de experimentación que no implique el uso de animales, siempre que sea posible.
2. Reducción: reducir el número de animales al mínimo posible.
3. Refinar: mejorar los métodos existentes para disminuir el dolor y/o malestar de los animales.

Los seis criterios de Terblanche y Hickman son:

1. Reversibilidad.
2. Reproducibilidad.
3. Muerte por fallo hepático.
4. Existencia de ventana terapéutica.
5. Tamaño apropiado (que permita el muestreo de sangre y tejido de forma frecuente).
6. Ser un riesgo mínimo para el personal.

Los criterios de van de Kerkhove et al. son:

- Definir claramente los objetivos o “*end-points*”, debiendo ser siempre el objetivo principal en la IHA la supervivencia, quedando como secundarios los parámetros clínicos y analíticos.
- Realizar un estudio piloto previo o utilizar un modelo ya descrito, con el fin de evitar errores y superar la curva de aprendizaje que conlleva el desarrollo de todo modelo.
- Establecer dos grupos, uno de IHA y otro control, y en el caso de ensayos dirigidos al estudio de dispositivos bioartificiales, un tercero de control del dispositivo.
- Realizar un cálculo estadístico de la *n* necesaria para alcanzar un poder estadístico suficiente que detecte las posibles diferencias entre grupos. Un número de 5 animales por grupo se considera adecuado.
- Elegir machos o hembras, ya que existen diferencias de comportamiento dentro de una misma especie según el sexo.
- Utilizar un protocolo de anestesia adecuado.
- Evitar las pérdidas sanguíneas, las transfusiones y los períodos largos de clamplaje, en caso de modelos quirúrgicos.
- Mantener la temperatura corporal del animal, ya que ésta influye en la IHA, especialmente en los síntomas neurológicos.

4.2.1. Estudio de dosis

El modelo experimental de insuficiencia hepática aguda inducida por toxicidad con CCl₄, es un modelo desarrollado y utilizado desde hace muchos años. Sin embargo, una vez filtrados y seleccionados los estudios publicados por el tipo de animal utilizado — rata Sprague-Dawley —, se pone de manifiesto la enorme variabilidad de las dosis utilizadas, haciendo necesario, por tanto, validar en nuestro

4. MATERIAL Y MÉTODOS

laboratorio la cantidad de CCl_4 necesaria para obtener un modelo de IHA óptimo con el cual poder realizar posteriormente el estudio de supervivencia con ASCs.

Para ello, se establece que la dosis óptima debe cumplir los siguientes criterios:

1. Provocar necrosis hepática de alto grado — grado IV en nuestra escala —, en todos los animales tratados.
2. Provocar, al menos, una mortalidad del 20% como consecuencia directa del fallo hepático, que se acreditará mediante estudio necrópsico.
3. Provocar, en al menos un 50% de los animales tratados, lesión hepática medida por parámetros bioquímicos³⁷³.

La determinación de existencia de lesión hepática según los parámetros bioquímicos, se establece según el documento de consenso publicado por Bénichou³⁷³, por la elevación dos veces por encima del límite superior normal de la ALT o de la bilirrubina conjugada, o por la elevación conjunta de la AST, FA y B_T , siempre y cuando al menos uno de los valores sea superior a dos veces su límite superior normal.

Se establecen 5 grupos de 5 ratas cada uno, a los que se les administra, mediante inyección intraperitoneal, una solución de CCl_4 y aceite de oliva virgen, con dosis crecientes de CCl_4 , que se nombran como D_1 , D_2 , D_3 , D_4 y D_5 :

- $\text{D}_1 = 2 \text{ mL/Kg}$ al 20%
- $\text{D}_2 = 3 \text{ mL/Kg}$ al 20%
- $\text{D}_3 = 4 \text{ mL/Kg}$ al 20%
- $\text{D}_4 = 5 \text{ mL/Kg}$ al 20%
- $\text{D}_5 = 5 \text{ mL/Kg}$ al 25%

Y se establece un grupo control con $n = 10$, a cuyos individuos sólo se les inyecta aceite de oliva virgen, a razón de 5 mL/Kg y que se nombra como D_0 .

De cada individuo de cada uno de los grupos se obtienen muestras de sangre, según la técnica descrita previamente, a las 24h, 48h y 1 semana de la inyección de CCl_4 , para análisis de AST, ALT, FA y B_T . Se practica necropsia a todo animal

fallecido antes de la última extracción sanguínea y el resto se sacrifica, según el protocolo establecido.

Una vez hallada una dosis que cumple los criterios bioquímicos de lesión hepática, que en nuestro caso fue 5 mL/Kg al 25% (D₅), se establece un nuevo grupo de cinco ratas a las que se les administra la dosis elegida para confirmar los resultados analíticos y se nombra como D₅'.

Posteriormente, para realizar el estudio histológico y evaluar el daño hepático causado por las diferentes dosis utilizadas, se sacrifican 6 ratas por dosis — 2 a 24h, 2 a 48h y 2 a los 7 días —, con las dosis D₁, D₂, D₃, D₄ y D₀, y se les extrae el hígado, que se lava en suero salino fisiológico 0.9% y se incluye en parafina, se corta y se le aplica una tinción de HE para estudio con microscopía óptica.

Para la dosis definitiva de 5 mL/Kg al 25 % correspondiente a los grupos D₅ y D₅', se crea un nuevo grupo con n = 15 (D₆), al que se le extrae sangre a las 24h, 48h y 1 semana, sacrificando 5 animales en cada tiempo y extrayendo los hígados, que se procesan de la misma forma que los del resto de las dosis.

Con los datos obtenidos, se realiza un estudio estadístico comparativo de los parámetros analíticos de cada grupo, la necrosis hepática inducida y su mortalidad.

4.2.2. Estudio de inducción de IHA con CCl₄ y tratamiento con ASCs

Grupo control aceite (0)

El grupo control de aceite de oliva utilizado, por razones éticas y por tener un tamaño muestral suficiente, es el mismo grupo D₀ establecido en el estudio de dosis.

Grupo control ASCs (1)

Se crea un segundo grupo control con $n = 15$ de ratas, en las que no se induce IHA y a las que se les administra 1×10^6 de ASCs, a las que igualmente se les extraen analíticas y se sacrifican a las 24h, 48h y 7 días de la inyección, en grupos de 5, extrayendo hígado, bazo y pulmones.

Grupo CCl₄ (2)

Se crea un nuevo grupo con 15 animales a los que se les administra la dosis definitiva establecida en el estudio de dosis y a los que se les extrae sangre a las 24h, 48h y 1 semana. De este modo, tenemos un tamaño muestral de $n = 30$ ratas a las que se les ha administrado una dosis de CCl₄ de 5 mL/Kg al 25%, ya que incluimos en esta parte del estudio al grupo D₆, por las mismas razones éticas de ahorrar animales de experimentación no necesarios. Se estipuló de forma previa al estudio sacrificar 5 ratas por tiempo, como se describe en el siguiente esquema (CCl₄ a). Debido a la mortalidad a las 24h y 48h en estos dos grupos, el número de sacrificios por tiempo fue menor de lo esperado (esquema, grupo CCl₄ b).

Grupo CCl₄ + ASCs (3)

A continuación, se crea un grupo de $n = 30$, al que se le administra la misma dosis de CCl₄ (5 mL/Kg al 25%) y posteriormente, a los 30 minutos de la punción intraperitoneal, se le inyecta 1×10^6 de ASCs marcadas con DAPI y PKH26, previa extracción de 1 mL de sangre para mantener la volemia. Se extraen, asimismo, muestras de sangre para estudio bioquímico a las 24h, 48h y 1 semana postpunción, sacrificando 5 ratas en cada momento, de manera similar al grupo sin tratamiento con células madre (grupo 1), extrayéndose hígado, bazo y pulmón.

Con los datos obtenidos, se realiza un estudio comparativo entre grupos, comparando los datos bioquímicos e histológicos, la presencia o ausencia de células ASC en el hígado, así como su distribución en el parénquima hepático y la mortalidad.

4.2.3. Estudio de la ruta celular y evaluación cuantitativa del número de ASCs

Con el fin de analizar la distribución de las ASCs en los órganos de las ratas e identificar posibles filtros en los que éstas puedan quedar retenidas, se establecen dos grupos de $n = 15$ y $n = 30$.

Al primer grupo (el mismo grupo control del estudio de supervivencia), se le inyecta exclusivamente 1 mL de suero salino fisiológico al 0,9%, que contiene 1×10^6 ASCs marcadas con PKH26 (*Sigma-Aldrich®*, St. Louis, USA), a través de una vena lateral de la cola, según la técnica descrita y utilizada previamente, y se sacrifican 5 ratas en cada uno de los tiempos: 24h, 48h y 7 días.

Una vez sacrificadas, se extraen pulmones, bazo e hígado, que se fijan en parafina y se cortan de forma seriada con el vibrotomo. Los cortes histológicos obtenidos se tiñen con DAPI (*Sigma-Aldrich®*, St. Louis, USA).

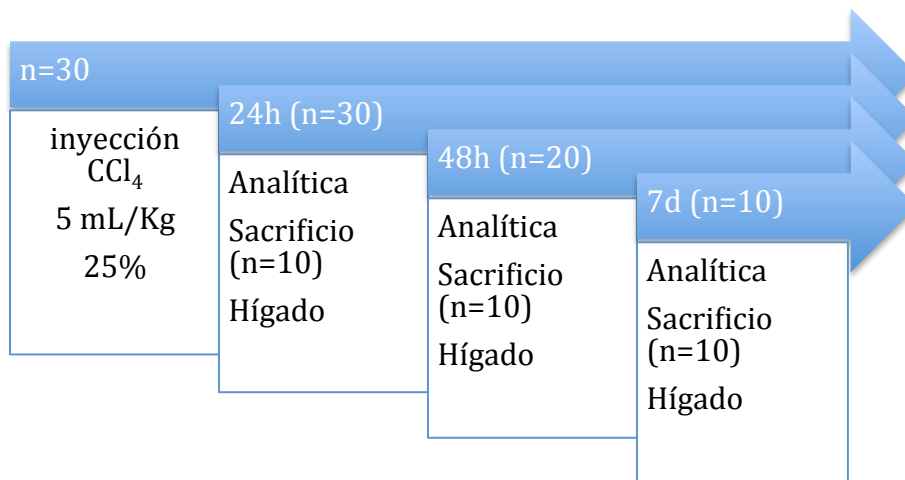
Al segundo grupo (el mismo grupo de IHA del estudio de supervivencia), se le inyecta CCl_4 a dosis de 5 mL/Kg al 25% intraperitoneal y a los 30 minutos, la misma dosis de ASCs que al grupo previo, igualmente marcadas con PKH26 (*Sigma-Aldrich®*, St. Louis, USA). Las ratas son sacrificadas a las 24h, 48h y 7d; 10 animales por tiempo, excepto a las 24h, que son 9 debido a un exitus. Y se extraen pulmones, bazo e hígado, que se fijan en parafina y se cortan de forma seriada con el vibrotomo. Los cortes histológicos obtenidos se tiñen con DAPI (*Sigma-Aldrich®*, St. Louis, USA).

Después, se realiza una selección aleatoria de muestras histológicas de cada uno de los órganos extraídos de cada individuo y se realiza un recuento celular bajo microscopía de fluorescencia. El recuento se lleva a cabo identificando y contabilizando el número de células marcadas con PKH26 en 5 campos de 40x aumentos, elegidos de forma aleatoria en cada cristal y calculando la media de células por campo.

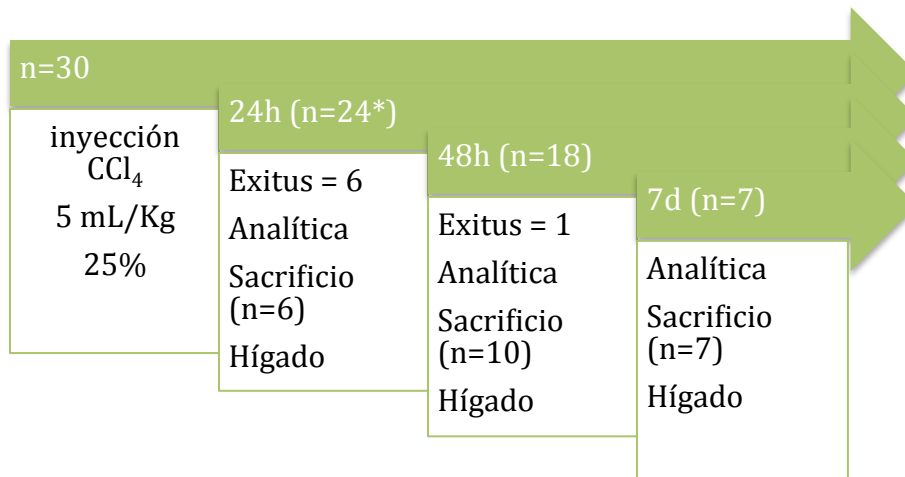
ESTUDIO DE IHA CON CCl₄ Y TRATAMIENTO CON ASCs

Grupo CCl₄

a)



b)



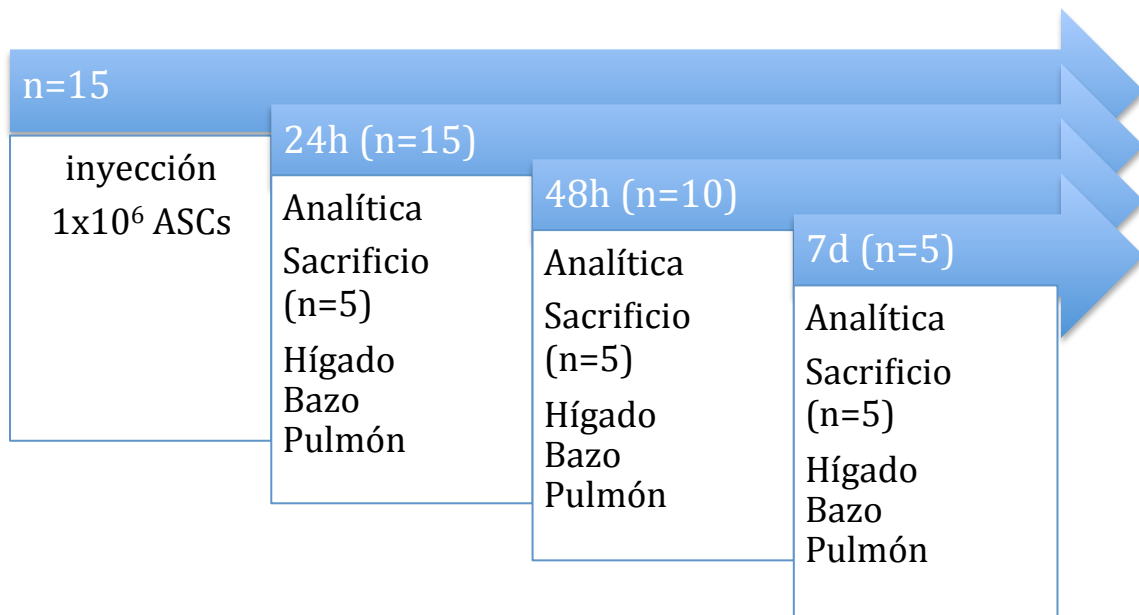
*De la rata muerta a las 48h no se pudo extraer sangre a las 24h tampoco porque se coagulaba la muestra.

Grupo CCl₄ + ASCs

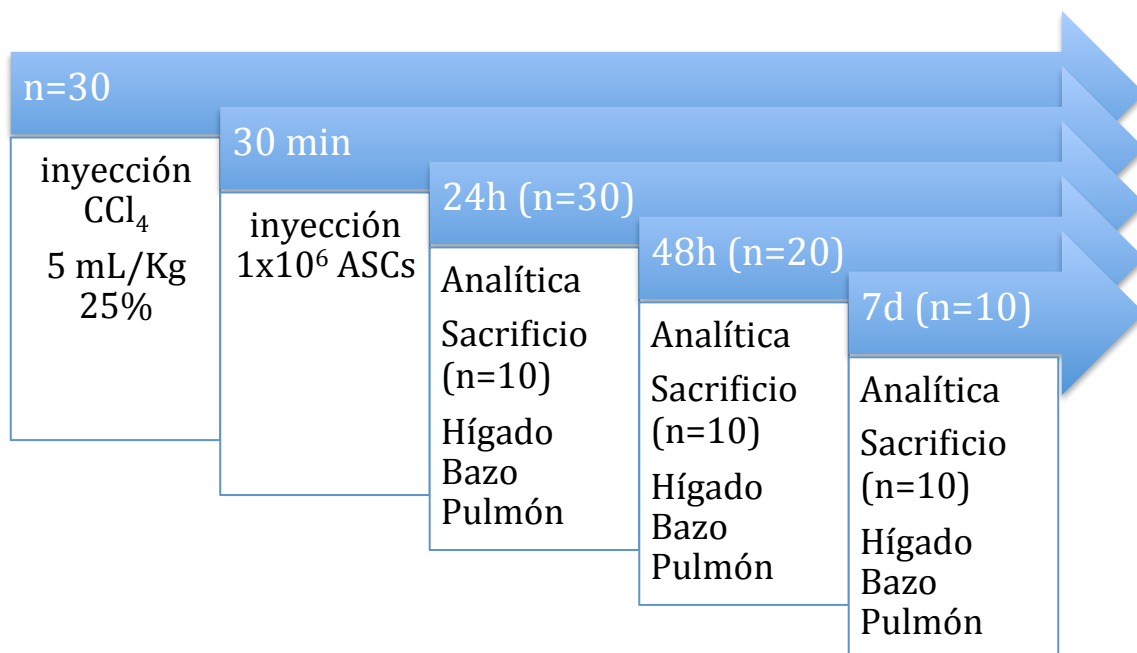


ESTUDIO DE LA RUTA CELULAR

Grupo ASCs



Grupo CCl_4 + ASCs



4.3. Método estadístico

Se presentan estadísticas descriptivas resumen de las variables continuas en los tres momentos diferentes, incluyendo número de sujetos, media, desviación típica, mediana, mínimo y máximo. Para los datos categóricos, se presentan las distribuciones de frecuencia (absoluta y relativa). Además, si procede, se calculan intervalos de confianza del 95%.

4.3.1. Estudio de dosis

Para analizar los cambios de los parámetros cuantitativos de perfil hepático a lo largo de los tres momentos entre los cinco grupos de dosis, se han usado modelos de regresión lineal con efectos mixtos — generalización de los modelos de regresión y análisis de la varianza —, para controlar el efecto de las correlaciones inducidas al tener medidas repetidas en los mismos sujetos a lo largo del tiempo.

Se estudian tanto efectos principales como de interacción entre ambos factores — un efecto de interacción significativo indicaría diferencia en el perfil de evolución —. Las comparaciones “*post-hoc*” se realizan usando el método de Bonferroni.

En el análisis de la evolución de los parámetros ALT y AST se ha usado la transformación logaritmo en base 10 para homogeneizar la variabilidad en los grupos.

4.3.2. Estudio de inducción de IHA con CCl₄ y tratamiento con ASCs

Para analizar los cambios de los parámetros cuantitativos de perfil hepático a lo largo de los tres momentos entre los cinco grupos, se han usado modelos de regresión lineal con efectos mixtos para controlar el efecto de las correlaciones inducidas al tener medidas repetidas en los mismos sujetos a lo largo del tiempo.

Se estudian tanto efectos principales como de interacción entre ambos factores — un efecto de interacción significativo indicaría diferencia en el perfil de evolución —. Las comparaciones “*post-hoc*” se realizan usando el método de Bonferroni.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

El tiempo hasta el exitus se ha estimado usando el método de Kaplan-Meier. Para comparar el tiempo hasta el exitus entre los diferentes grupos, se ha usado el estadístico “*log-rank test*”.

El análisis de los datos recogidos se realiza mediante el programa estadístico SAS 9.1.3.

5. RESULTADOS

5.1. Estudio de dosis

5.1.1. Análisis bioquímico

Análisis descriptivo

En la tabla 20 se muestran los valores de cada parámetro bioquímico analizado por rata y tiempo.

AST

Existe una elevación sérica media global a las 24h de 1.374,93 UI con un máximo de 9.663 UI, que desciende rápidamente a las 48h, donde la media es de 468,59 UI y el máximo de 2.829 UI, para alcanzar cifras normales a los 7 días postinyección de CCl₄, donde la media de AST es de 87,15 UI con un máximo de 146 UI.

Al realizar un análisis por grupo, observamos que el mayor valor medio y el mayor valor máximo a las 24h y 48h pertenecen al grupo de dosis de 5 mL/Kg al 25%, — 2.082,25 y 9.663 UI a las 24h y 893,25 y 2.829 UI a las 48h —, pero sin embargo, los valores medios plasmáticos en los grupos D₁ y D₂ son superiores que en los grupos D₃ y D₄ a las 24h, mientras que a las 48h son mayores las cifras medias en D₃ y D₄ que en D₁ y D₂, por lo que no existe una relación dosis-dependiente. A los 7 días, los valores medios, mínimos y máximos (rango) no presentan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de dosis, estando dentro de los valores de referencia.

Además, en todos los grupos, para una misma dosis, hubo individuos con y sin elevación de los niveles plasmáticos de AST.

En la tabla 21 se muestran los descriptores estadísticos y en la gráfica 1 se representan los valores plasmáticos medios de AST a las 24h, 48h y 7 días en cada uno de los grupos del estudio.

5. RESULTADOS

ALT

De forma similar a la AST, la ALT presenta de forma global una elevación sérica máxima a las 24h, con una media de 552,85 UI y un máximo de 5.095 UI con un rápido descenso a las 48h, donde la media es de 245,11 UI y el máximo 1.218 UI, y una normalización de los valores plasmáticos a los 7 días postinyección de CCl₄, con una media de 35,07 UI y un máximo de 71 UI.

En nuestro estudio, todas las elevaciones de ALT por encima de su valor máximo de referencia, se acompañaron de una elevación de AST, con excepción de dos casos, en los que a una elevación de ALT o de AST no le correspondió una elevación del otro, como se puede observar en la tabla 20.

Igualmente, en todos los grupos, para una misma dosis, hay individuos con y sin elevación de los niveles plasmáticos de ALT y las medias de cada uno de los grupos tampoco mantienen una relación dosis-dependiente, siendo en D₄, por ejemplo, inferior tanto a 24h como a 48h con respecto al resto de grupos.

En la tabla 22 se muestran los descriptores estadísticos y en la gráfica 2 se representan los valores plasmáticos medios de ALT a las 24h, 48h y 7 días en cada uno de los grupos del estudio.

FA

La fosfatasa alcalina no se elevó en los grupos D₁, D₂, D₃ ni D₄. Sin embargo, hubo un leve aumento de los valores plasmáticos en dos individuos del grupo D₅, normalizándose dichos valores a las 48h y permaneciendo normales a los 7 días tras la inyección de CCl₄. La media global a las 24h fue de 264,26 UI, mientras que la media específica del grupo D₅ fue de 411,63 UI. La media del resto de grupos está por debajo de la media global.

En la tabla 23 se muestran los descriptores estadísticos gráfica 3 se representan los valores plasmáticos medios de FA a las 24h, 48h y 7 días en cada uno de los grupos del estudio.

B_T

La bilirrubina total sigue un patrón de elevación y descenso más arbitrario que el resto de parámetros analizados, presentando individuos, en todos los grupos de dosis, tanto con cifras plasmáticas normales como elevadas. De forma general, el aumento de los niveles séricos de bilirrubina total en todos los individuos en los que está aumentada, es mínimo en relación a la elevación de las transaminasas. Sin embargo, aquellos individuos que presentan una hipertransaminasemia más acusada, son los que presentan una mayor elevación de la bilirrubina total.

Pese a este patrón arbitrario, en el que el pico sérico máximo en unos individuos es a las 24h y en otros a las 48h, la tendencia es una elevación de los niveles plasmáticos a las 24h, con un descenso progresivo a las 48h y a los 7 días, momento en el que las cifras de bilirrubina total se encuentran dentro de su rango de referencia.

En la tabla 24 se muestran los descriptores estadísticos gráfica 4 se representan los valores plasmáticos medios de B_T a las 24h, 48h y 7 días en cada uno de los grupos del estudio.

5. RESULTADOS

	24h					48h					7d				
	AST	ALT	FA	Br		AST	ALT	FA	Br		AST	ALT	FA	Br	
20% 2 mL/Kg	5.509	1.646	324	0,23		334	223	273	0,2		106	29	253	0,12	
	164	88	173	0,07		96	54	168	0,15		146	37	184	0,08	
	114	43	134	0,09		95	40	136	0,1		108	36	171	0,12	
	399	123	148	0,17		166	61	130	0,15		76	31	160	0,16	
	111	45	194	0,06		90	36	168	0,13		81	30	167	0,12	
20% 3 mL/Kg	240	46	176	0,15		146	46	156	0,14		90	33	219	0,14	
	1.394	603	179	0,19		478	263	164	0,15		111	35	198	0,12	
	2.441	697	202	0,19		286	126	183	0,16		88	26	132	0,12	
	2.561	536	207	0,26		261	88	193	0,06		72	28	139	0,13	
	167	54	278	0,17		106	45	187	0,13		84	29	122	0,11	
20% 4 mL/Kg	1.135	852	226	0,26		521	496	165	0,2		77	43	212	0,16	
	551	157	224	0,27		440	138	192	0,2		86	33	240	0,15	
	252	63	166	0,21		223	78	175	0,13		88	45	186	0,14	
	1.205	631	298	0,17		616	378	224	0,18		74	71	259	0,13	
	541	55	143	0,21		240	36	136	0,12		127	37	178	0,14	
20% 5 mL/Kg	410	76	186	0,19		214	53	159	0,18		74	28	172	0,15	
	301	55	158	0,21		157	50	172	0,21		81	27	153	0,18	
	98	38	132	0,16		88	52	148	0,16		74	41	138	0,12	
	2.872	1.020	294	0,44		949	521	263	0,33		60	26	190	0,14	
	x	x	x	x		x	x	x	x		x	x	x	x	
25% 5 mL/Kg	150	51	450	0,21		133	49	271	0,02		69	36	187	0,15	
	100	44	370	0,11		85	39	275	0,13		-	-	-	-	
	159	55	537	0,17		82	25	158	0,02		71	32	217	0,12	
	2.634	1.039	478	0,99		2.829	1.076	459	0,72		73	26	170	0,15	
	3.098	1.473	563	0,52		2.111	1.218	328	0,34		79	39	163	0,14	
	104	56	276	0,09		104	45	249	0,2		95	39	239	0,16	
	750	286	241	0,26		597	213	212	0,2		89	46	250	0,14	
	9.663	5.095	378	0,22		1.205	1.169	318	0,44		87	28	231	0,16	
	x	x	x	x		x	x	x	x		x	x	x	x	
	x	x	x	x		x	x	x	x		x	x	x	x	

Tabla 20. Valores AST, ALT, FA y Br de cada rata, según la dosis y el tiempo, en el estudio de dosis.

x = fallecido

- = muestra insuficiente

5. RESULTADOS

AST							
Tiempo	Dosis	n	\bar{x}	σ	M_e	Mín	Máx
24h	D ₁	5	1.259,40	2.378,553	164,00	111	5.509
	D ₂	5	1.360,60	1.149,974	1.394,00	167	2.561
	D ₃	5	736,80	414,024	551,00	252	1.205
	D ₄	4	920,25	1.307,574	355,50	98	2.872
	D ₅	8	2.082,25	3.291,854	454,50	100	9.663
	Total	27	1.374,93	2.116,983	410,00	98	9.663
48h	D ₁	5	156,20	104,236	96,00	90	334
	D ₂	5	255,40	145,608	261,00	106	478
	D ₃	5	408,00	172,848	440,00	223	616
	D ₄	4	352,00	401,320	185,50	88	949
	D ₅	8	893,25	1.064,175	365,00	82	2.829
	Total	27	468,59	647,149	223,00	82	2.829
7d	D ₁	5	103,40	27,817	106,00	76	146
	D ₂	5	89,00	14,142	88,00	72	111
	D ₃	5	90,40	21,291	86,00	74	127
	D ₄	4	72,25	8,808	74,00	60	81
	D ₅	7	80,43	10,048	79,00	69	95
	Total	26	87,15	19,122	82,50	60	146

Tabla 21. AST, descriptores estadísticos de los grupos del estudio de dosis.

n = tamaño muestral; \bar{x} = media; σ = desviación estándar; M_e = mediana;

Mín = valor mínimo; Máx = valor máximo

ALT							
Tiempo	Dosis	n	\bar{x}	σ	M_e	Mín	Máx
24h	D ₁	5	389,00	703,466	88,00	43	1.646
	D ₂	5	387,20	313,100	536,00	46	697
	D ₃	5	351,60	366,604	157,00	55	852
	D ₄	4	297,25	482,084	65,50	38	1.020
	D ₅	8	1.012,38	1.736,233	171,00	44	5.095
	Total	27	552,85	1.021,547	88,00	38	5.095
48h	D ₁	5	82,80	79,030	54,00	36	223
	D ₂	5	113,60	90,007	88,00	45	263
	D ₃	5	225,20	201,090	138,00	36	496
	D ₄	4	169,00	234,670	52,50	50	521
	D ₅	8	479,25	563,453	131,00	25	1.218
	Total	27	245,11	355,648	61,00	25	1.218
7d	D ₁	5	32,60	3,647	31,00	29	37
	D ₂	5	30,20	3,701	29,00	26	35
	D ₃	5	45,80	14,873	43,00	33	71
	D ₄	4	30,50	7,047	27,50	26	41
	D ₅	7	35,14	6,986	36,00	26	46
	Total	26	35,04	9,472	33,00	26	71

Tabla 22. ALT, descriptores estadísticos de los grupos del estudio de dosis.

n = tamaño muestral; \bar{x} = media; σ = desviación estándar; M_e = mediana;

Mín = valor mínimo; Máx = valor máximo

5. RESULTADOS

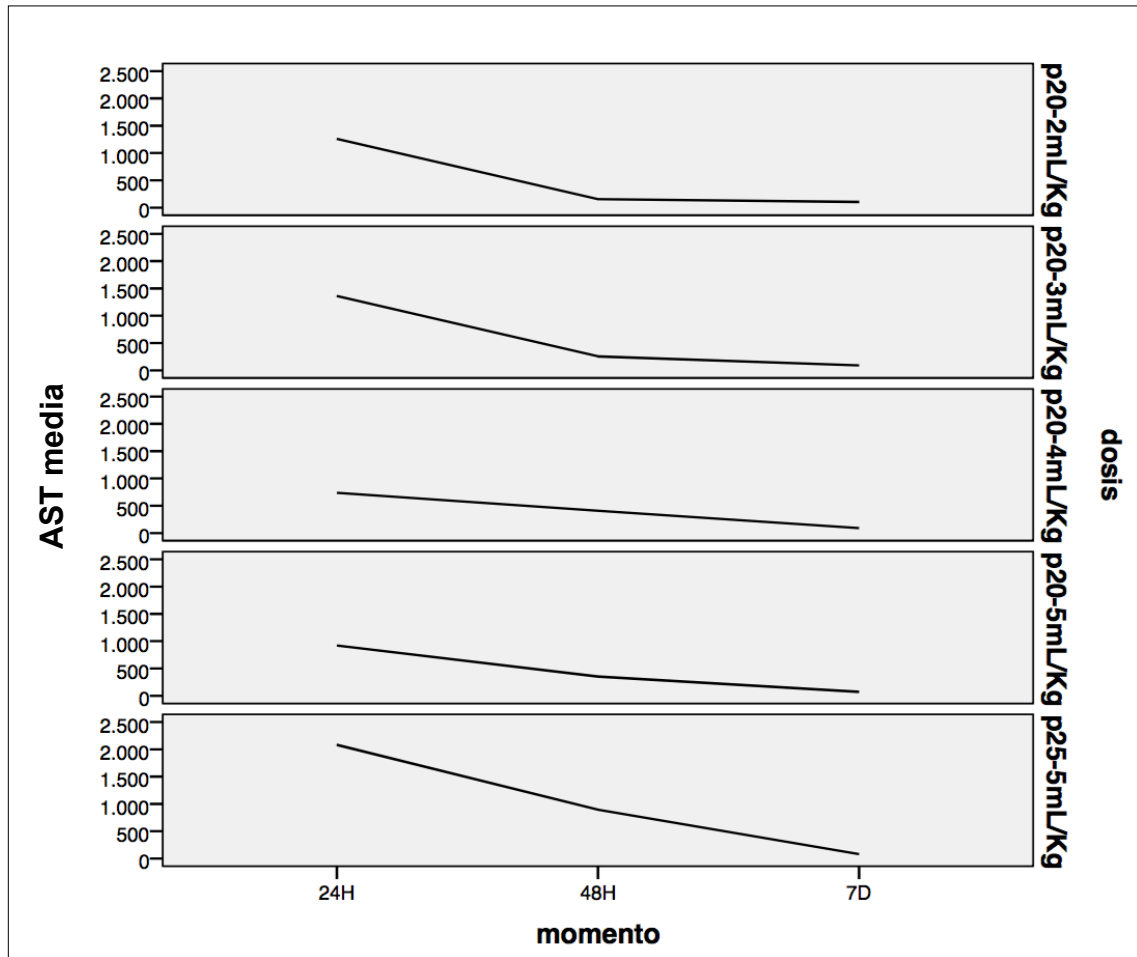
FA							
Tiempo	Dosis	n	\bar{x}	σ	M_e	Mín	Máx
24h	D ₁	5	194,60	75,920	173,00	134	324
	D ₂	5	208,40	41,235	202,00	176	278
	D ₃	5	211,40	60,438	224,00	143	298
	D ₄	4	192,50	71,169	172,00	132	294
	D ₅	8	411,63	116,424	414,00	241	563
	Total	27	264,26	124,454	224,00	132	563
48h	D ₁	5	175,00	57,550	168,00	130	273
	D ₂	5	176,60	15,821	183,00	156	193
	D ₃	5	178,40	32,608	175,00	136	224
	D ₄	4	185,50	52,590	165,50	148	263
	D ₅	8	283,75	89,643	273,00	158	459
	Total	27	209,70	74,848	183,00	130	459
7d	D ₁	5	187,00	37,914	171,00	160	253
	D ₂	5	162,00	43,514	139,00	122	219
	D ₃	5	215,00	34,569	212,00	178	259
	D ₄	4	163,25	22,618	162,50	138	190
	D ₅	7	208,14	34,749	217,00	163	250
	Total	26	189,62	39,566	185,00	122	259

Tabla 23. FA, descriptores estadísticos de los grupos del estudio de dosis.
n = tamaño muestral; \bar{x} = media; σ = desviación estándar; M_e = mediana;
Mín = valor mínimo; Máx = valor máximo

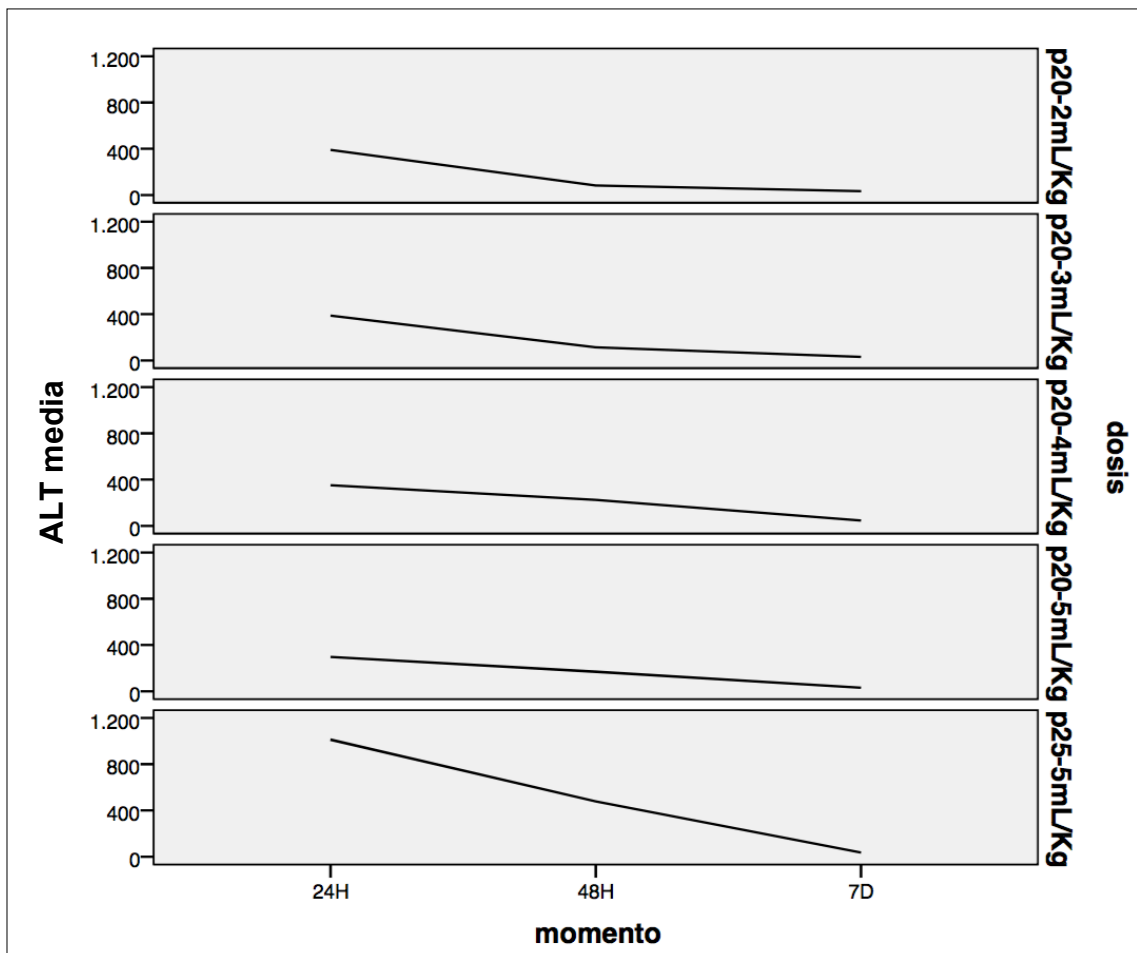
B _T							
Tiempo	Dosis	n	\bar{x}	σ	M_e	Mín	Máx
24h	D ₁	5	0,1240	0,07335	0,0900	0,06	0,23
	D ₂	5	0,1920	0,04147	0,1900	0,15	0,26
	D ₃	5	0,2240	0,04099	0,2100	0,17	0,27
	D ₄	4	0,2500	0,12832	0,2000	0,16	0,44
	D ₅	8	0,3213	0,30097	0,2150	0,09	0,99
	Total	27	0,2322	0,18084	0,1900	0,06	0,99
48h	D ₁	5	0,1460	0,03647	0,1500	0,10	0,20
	D ₂	5	0,1280	0,03962	0,1400	0,06	0,16
	D ₃	5	0,1660	0,03847	0,1800	0,12	0,20
	D ₄	4	0,2200	0,07616	0,1950	0,16	0,33
	D ₅	8	0,2588	0,23594	0,2000	0,02	0,72
	Total	27	0,1907	0,13837	0,1600	0,02	0,72
7d	D ₁	5	0,1200	0,02828	0,1200	0,08	0,16
	D ₂	5	0,1240	0,01140	0,1200	0,11	0,14
	D ₃	5	0,1440	0,01140	0,1400	0,13	0,14
	D ₄	4	0,1475	0,02500	0,1450	0,12	0,18
	D ₅	7	0,1457	0,01397	0,1500	0,12	0,16
	Total	26	0,1365	0,02077	0,1400	0,08	0,18

Tabla 24. B_T, descriptores estadísticos de los grupos del estudio de dosis.
n = tamaño muestral; \bar{x} = media; σ = desviación estándar; M_e = mediana;
Mín = valor mínimo; Máx = valor máximo

5. RESULTADOS

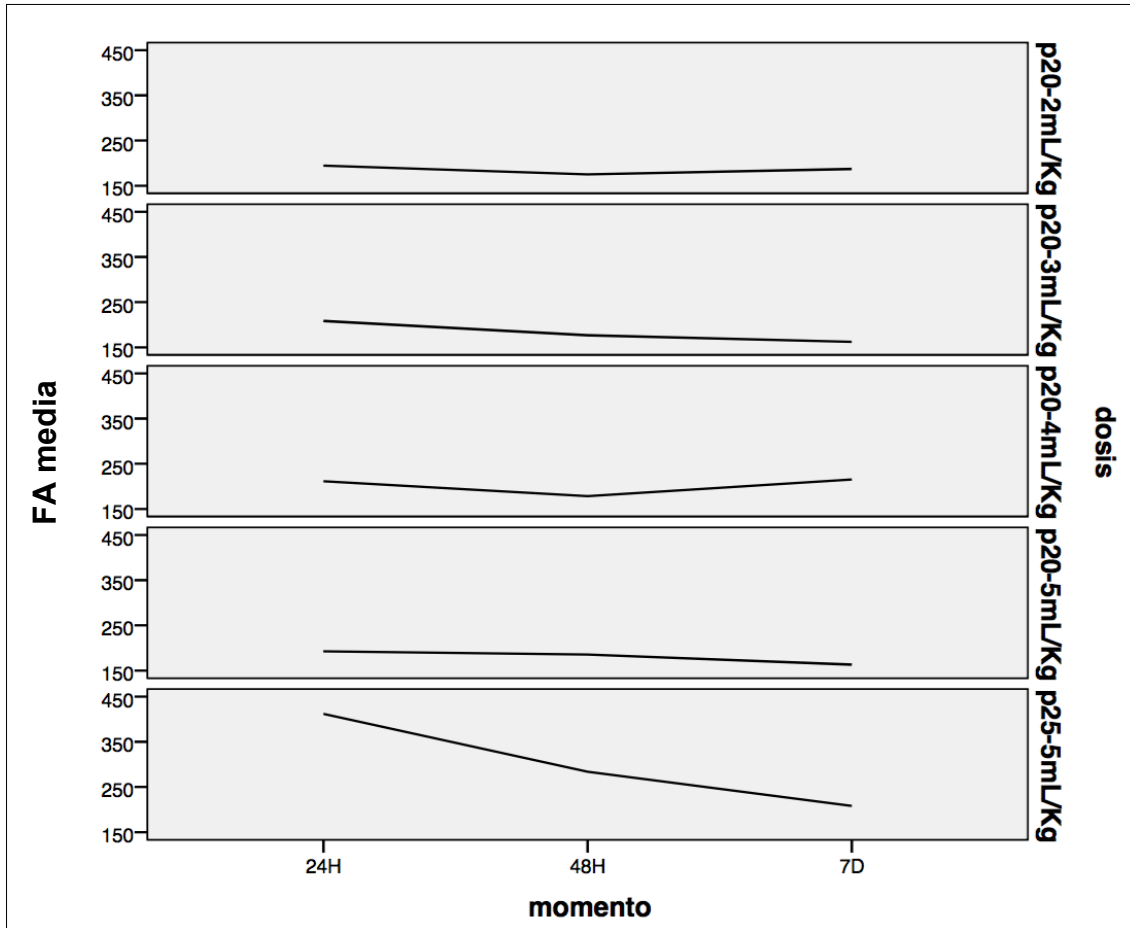


Gráfica 1. Distribución de la media de la AST, por grupo de dosis, a las 24h, 48h y 7 días de la inyección de CCl₄.

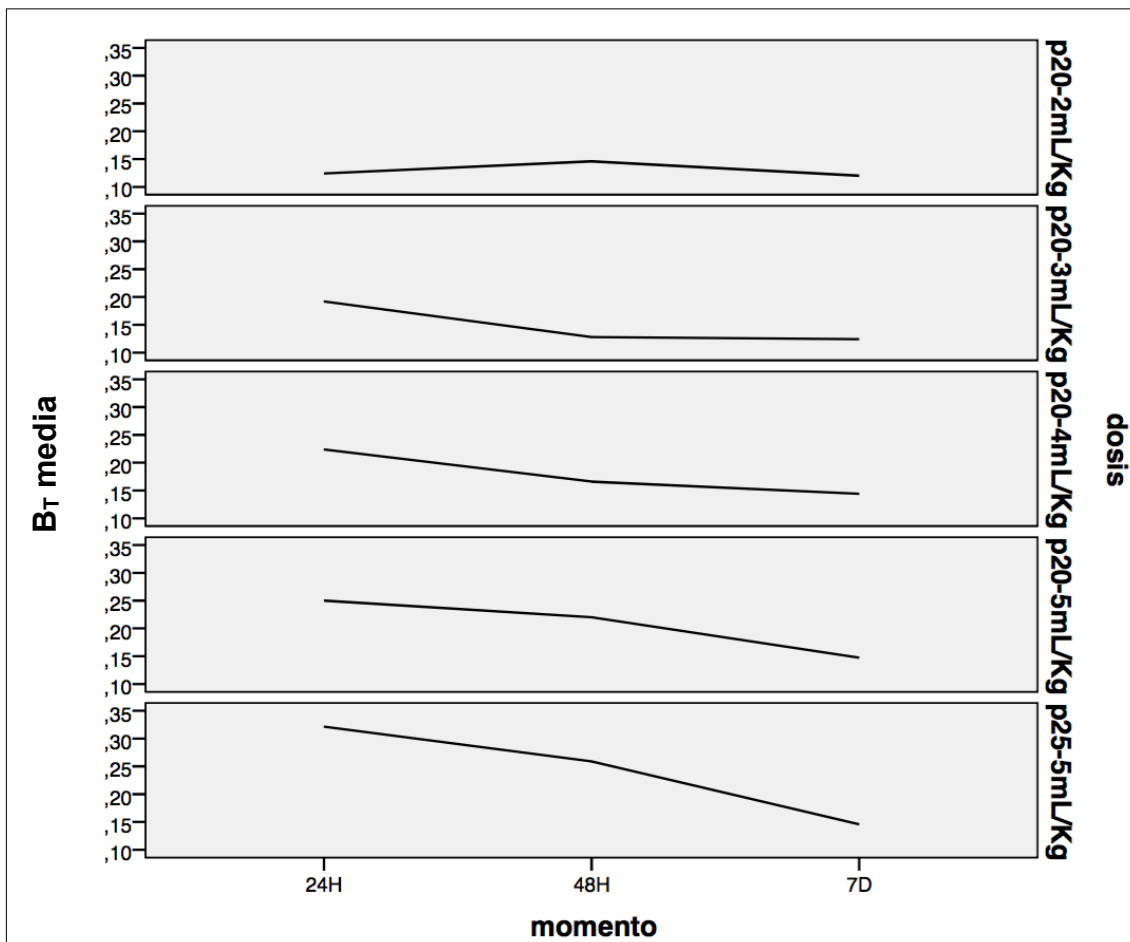


Gráfica 2. Distribución de la media de la ALT, por grupo de dosis, a las 24h, 48h y 7 días de la inyección de CCl₄.

5. RESULTADOS



Gráfica 3. Distribución de la media de la FA, por grupo de dosis, a las 24h, 48h y 7 días de la inyección de CCl₄.



Gráfica 4. Distribución de la media de la B_T, por grupo de dosis, a las 24h, 48h y 7 días de la inyección de CCl₄.

Análisis comparativo:

Realizamos un análisis de la variación de los niveles plasmáticos (variable dependiente) de AST, ALT, FA y B_T en función del tiempo, de la dosis y de la dosis en función del tiempo (variables independientes). La tabla 25 resume de forma global los resultados obtenidos en el análisis comparativo, mostrando el grado de significación de cada parámetro bioquímico según la variable independiente estudiada.

Al comparar los grupos con diferentes dosis de CCl₄ entre sí, observamos que la AST y la ALT tienen un comportamiento similar, con una evolución paralela a lo largo del tiempo entre las diferentes dosis.

Analizamos los grupos de forma conjunta, en vez de individualmente, para tener una mayor n y observamos diferencias significativas a lo largo del tiempo, concretamente a las 24h y 48h con respecto a 7d para la AST y entre las 48h y 7d para la ALT, independientemente de la dosis administrada (tabla 26).

Sin embargo, si utilizamos la transformación logarítmica para los niveles plasmáticos de AST y ALT y homogeneizar la variabilidad entre los grupos, alcanzamos diferencias estadísticamente significativas entre los 3 momentos analizados para ambos parámetros, independiente de la dosis administrada (tabla 25).

En el análisis de la FA, además de encontrar diferencias significativas a lo largo del tiempo, también encontramos diferencias entre las distintas dosis. En este caso, hay un aumento significativo de la FA en sangre a las 24h con respecto a las 48h y a 7d, independientemente de la dosis (tabla 25). Al realizar la transformación logarítmica sigue sin haber significación entre las 48h y 7d.

En cuanto a las diferencias entre dosis, en el grupo D₅ los niveles de FA a las 24h son superiores a las de todos los demás grupos, a las 48h sólo con respecto a D₁ y a los 7d no existen ya diferencias entre dosis (tabla 27).

Finalmente, no hubo cambios significativos en los niveles de BT, ni entre diferentes dosis, ni a lo largo del tiempo, (tablas 25 y 26).

5. RESULTADOS

	Tiempo	Dosis	Tiempo*Dosis
AST	0,019	0,692	0,584
ALT	0,048	0,553	0,591
FA	0,012	0,000	0,019
B_T	0,071	0,346	0,733

Tabla 25. Significación estadística de AST, ALT, FA y B_T, según el tiempo, la dosis y la interacción de la dosis en función del tiempo (tiempo*dosis); P<0,05.

momento		Sig. AST	Sig. Log ₁₀ (AST)	Sig. ALT	Sig. Log ₁₀ (ALT)	Sig. FA	Sig. Log ₁₀ (FA)	Sig. B _T	Sig. Log ₁₀ (B _T)
24h	48h	0,127	0,000	0,334	0,001	0,024	0,010	0,236	0,514
	7d	0,040	0,000	0,126	0,000	0,016	0,018	0,073	0,010
48h	24h	0,127	0,000	0,334	0,001	0,024	0,010	0,236	0,514
	7d	0,047	0,000	0,046	0,000	1,000	1,000	0,278	1,000
7d	24h	0,040	0,000	0,126	0,000	0,016	0,018	0,073	0,010
	48h	0,047	0,000	0,046	0,000	1,000	1,000	0,278	1,000

Tabla 26. Significación estadística de la variación sérica de AST, ALT, FA y B_T en función del tiempo, sin y con transformación logarítmica; Sig. = significación; P < 0.05.

momento	dosis	Sig. Log ₁₀ (FA)
24h	D ₅ D ₁	0,002
	D ₂	0,008
	D ₃	0,008
	D ₄	0,004
48h	D ₅ D ₁	0,032
	D ₂	0,065
	D ₃	0,065
	D ₄	0,152
7d	D ₅ D ₁	1,000
	D ₂	0,252
	D ₃	1,000
	D ₄	0,573

Tabla 27. Significación estadística de la variación sérica del log₁₀(FA) según la dosis en función del tiempo; Sig. = significación; P < 0.05.

5.1.2. Análisis histopatológico

Durante las necropsias, se realiza un estudio macroscópico de la superficie de los hígados, hallando lesiones blanquecinas con un patrón moteado en todos los lóbulos hepáticos, así como una capa amarillenta clara, de aspecto fibrinoso, en los hígados de las ratas destinadas para dicho fin y a las que se les ha administrado las dosis D₃, D₄ y D₅ (Figura 14).

Las muestras de tejido hepático obtenidas tras el sacrificio de las ratas de los diferentes grupos y su debida preparación, tal y como se detalla en el apartado 4.1., se tiñen con HE y se examinan con microscopía óptica de 10x, 20x y 40x aumentos.

En el grupo de control, D₀, al que sólo se le ha inyectado aceite de oliva virgen a dosis de 5 mL/Kg, se observa un parénquima hepático con arquitectura conservada y sin evidencia de lesión histológica alguna a las 24h, 48h y 7 días.

En el grupo D₆, al que se le administró la misma dosis CCl₄ que a D₅ (5 mL/Kg al 25%), a las 24h de su inyección encontramos diferentes grados de lesión histológica, pudiendo establecer una clasificación de tres grupos, según el grado de necrosis y siguiendo un método semicuantitativo descrito en el apartado de métodos.

El primer grupo está formado por hígados en los que la arquitectura parenquimatosa está conservada y los espacios porta presentan mínimos cambios con pequeños focos de citolisis y necrosis aislada (necrosis grado I), en el que se incluyen los grupos D₁ y D₂.

El segundo grupo, presenta en todas y cada una de las ratas intenso infiltrado inflamatorio con gran necrosis hepatocitaria localizada en zona 3 perivenular, asociada a marcada esteatosis microvacuolar y presencia de abundantes células balonizadas y en algunos casos, marcada necrosis hepatocitaria confluyente con necrosis en puentes (grados III y IV), (figuras 15 y 16).

Y el tercer grupo, presenta gran variabilidad en el grado de afectación hepática, con ratas que presentan un hígado sano o con lesiones de grado I, otras que presentan moderado infiltrado inflamatorio con necrosis hepatocitaria evidente,

5. RESULTADOS

asociada a leve esteatosis microvacuolar y presencia de escasas células balonizadas (necrosis grado II) y otras con necrosis grados III y IV, similar a lo que sucede con las dosis D₃ y D₄.

A las 48h, en todos los grupos hay una progresiva sustitución de la necrosis por células inflamatorias (figuras 17 y 18), especialmente en la zona perivenular, con un infiltrado más histiocítico que polimorfonuclear y a los 7 días, encontramos un hígado totalmente regenerado (figuras 19 y 20).

En las figuras 21 y 22 observamos la histología del grupo control a los 7 días.

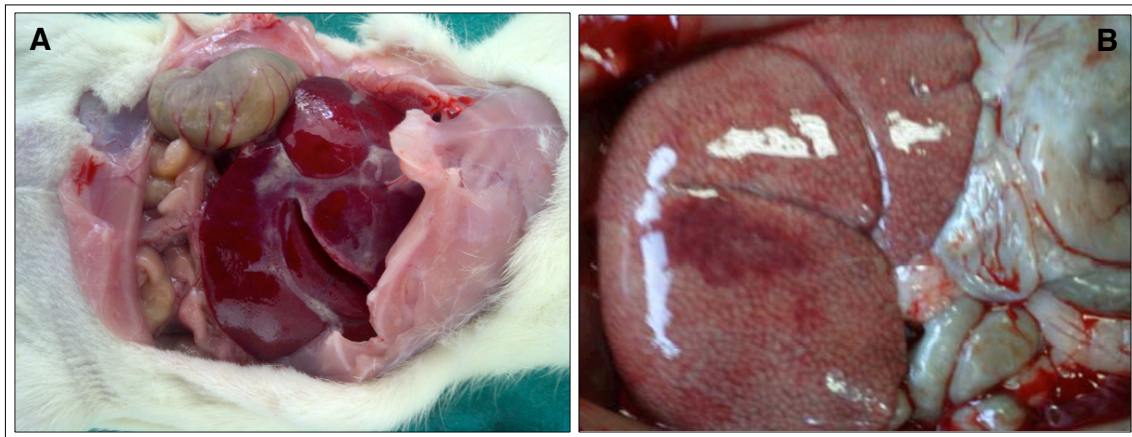
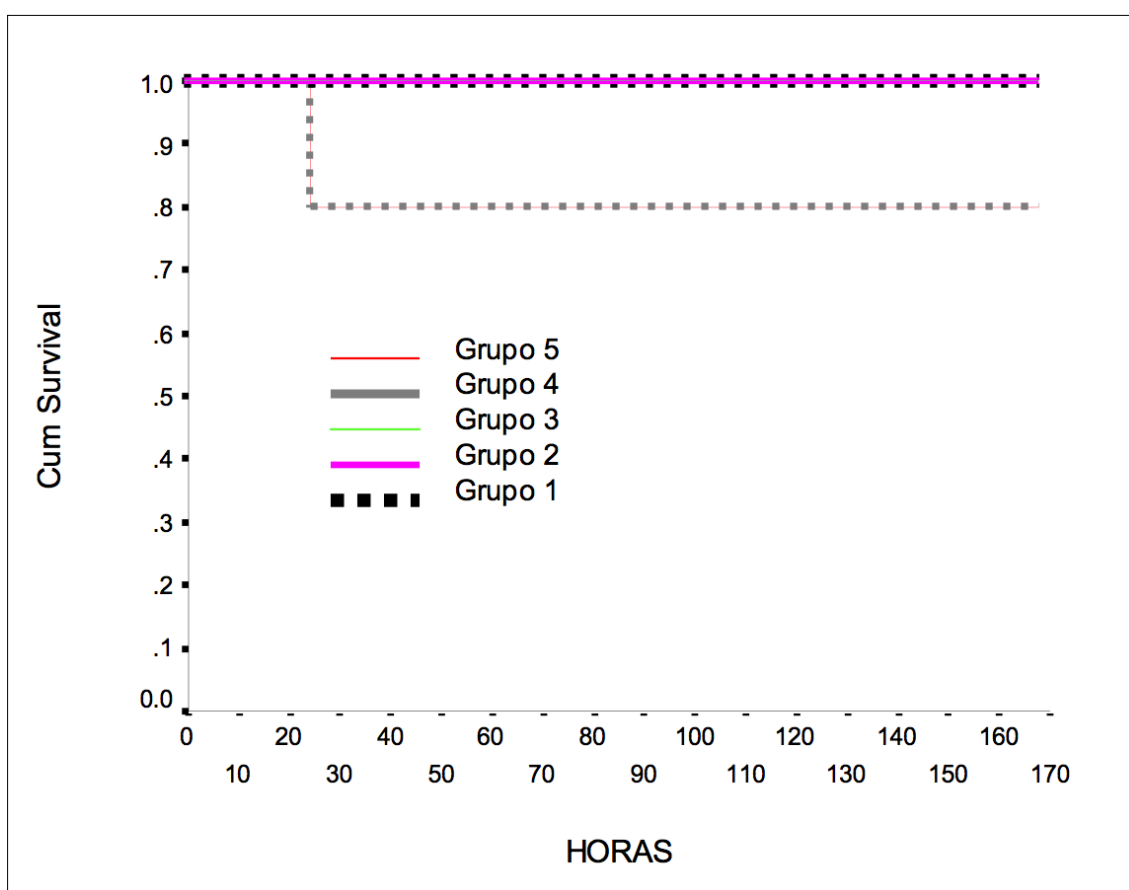


Figura 14. Necropsia. **A** Superficie hepática cubierta con material fibrinoso. **B** moteado con aspecto de “nuez moscada”.

5.1.3. Mortalidad

No hay mortalidad en los grupos D₁, D₂ y D₃, mientras que la mortalidad en el grupo D₄ es de un individuo de cinco (20,0%) y en el grupo D₅, dos individuos de diez (20,0%), produciéndose todos los exitus en las primeras 24h, no habiendo, por tanto, diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p= 0,521$); en la gráfica 5 se observan las curvas de supervivencia de los grupos correspondientes al estudio de dosis.



Gráfica 5. Curvas de Kaplan-Meier; análisis estadístico de la supervivencia.

Grupo 1= D1 (2 mL/Kg, 20%); Grupo 2 = D2 (3 mL/Kg, 20%); Grupo 3 = D3 (4 mL/Kg, 20%); Grupo 4 = D4 (5 mL/Kg, 20%); Grupo 5 = D5 (5 mL/Kg, 25%).

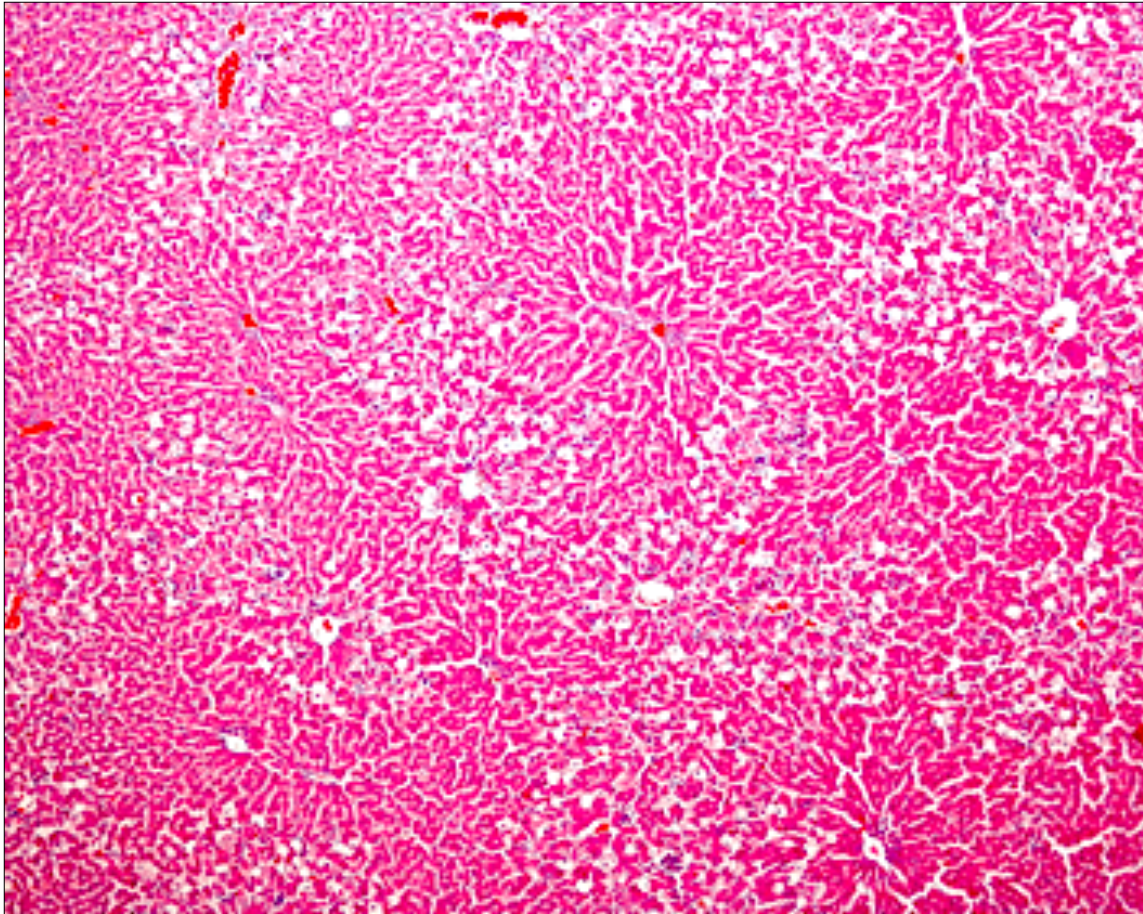


Figura 15. Necrosis hepática en grupo D₅ a las 24h. HE, 10x.

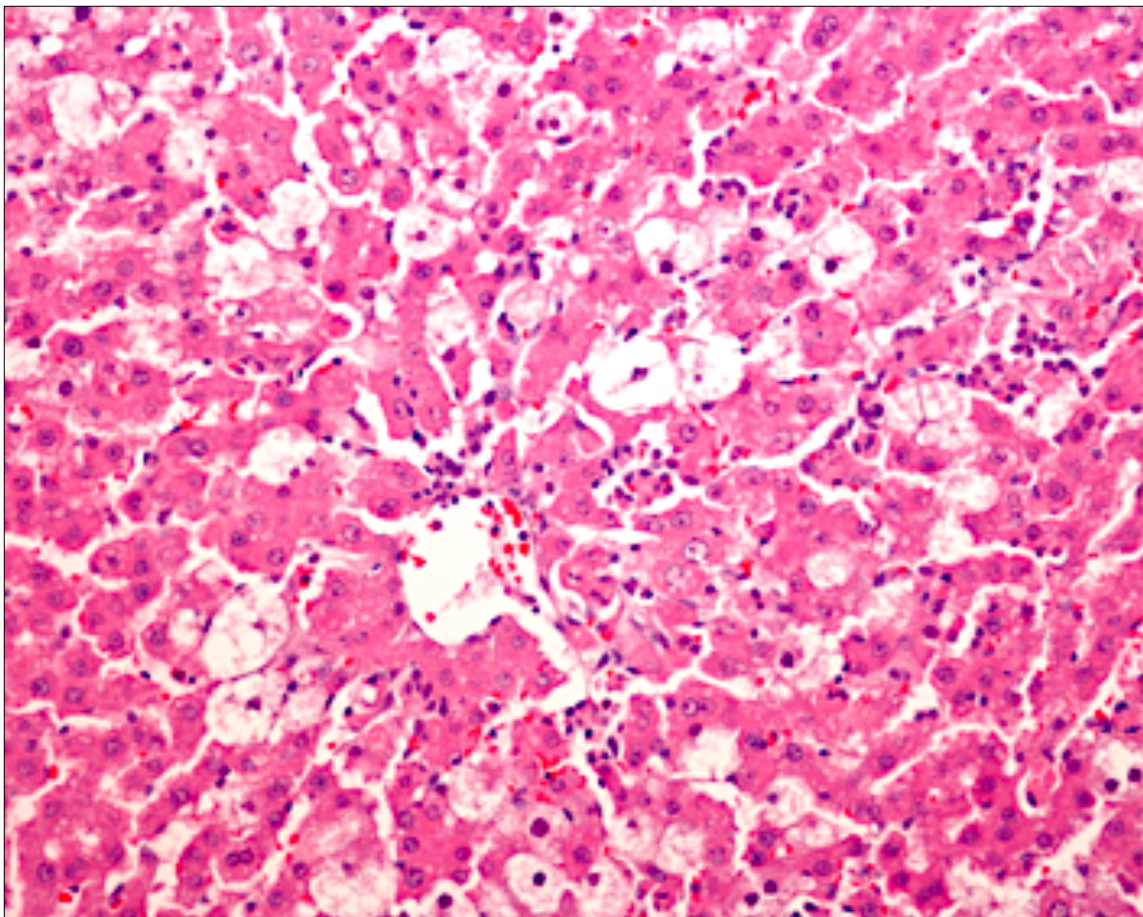


Figura 16. Necrosis hepática en grupo D₅ a las 24h. HE, 40x.

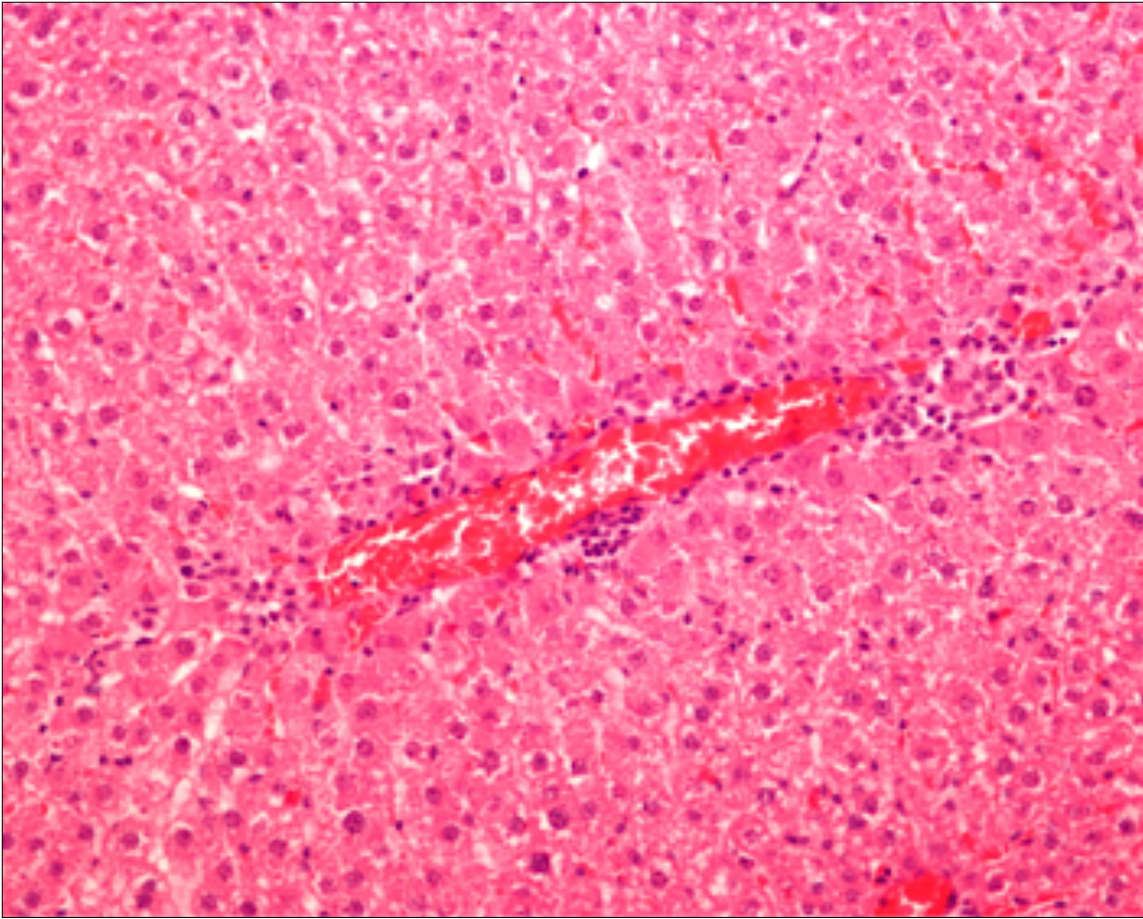


Figura 17. Necrosis hepática en grupo D₅ a las 48h. HE, 10x.

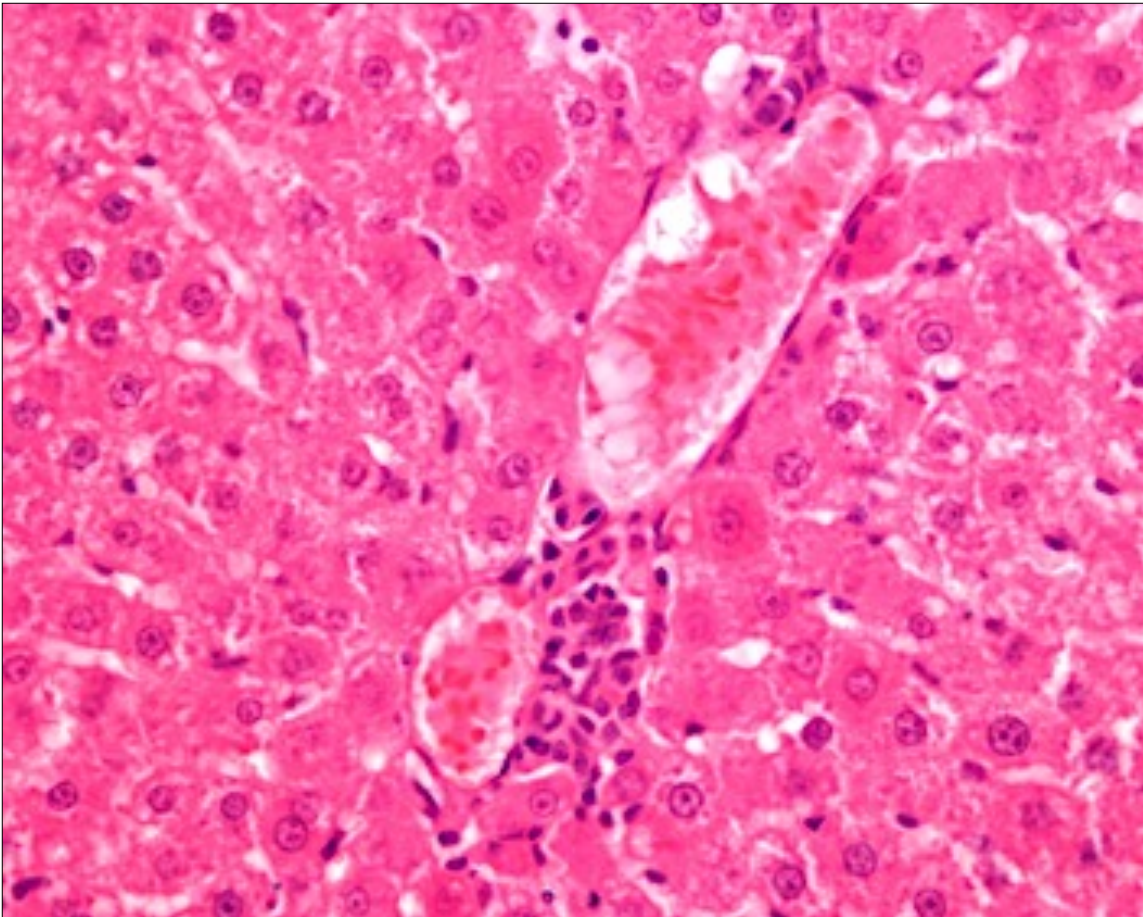


Figura 18. Necrosis hepática en grupo D₅ a las 48h. HE, 40x.

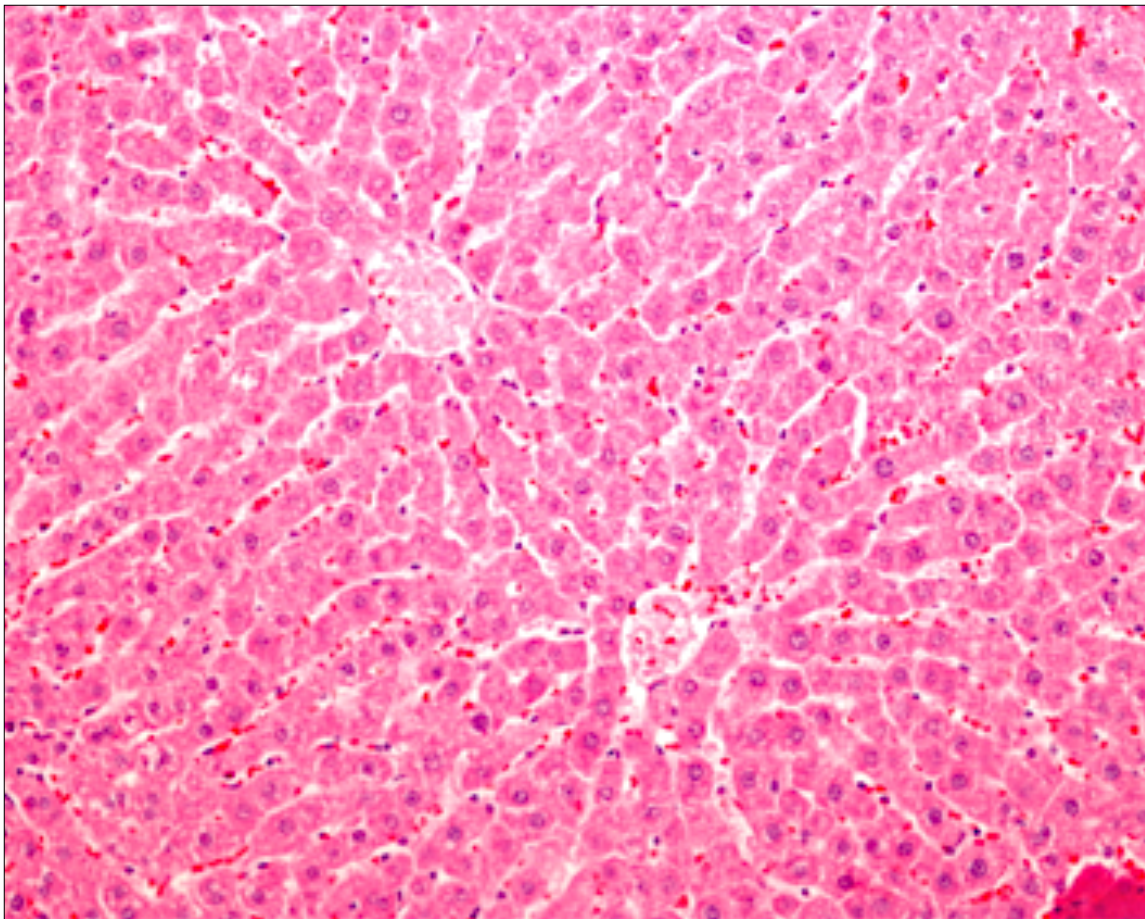


Figura 19. Histología hepática en grupo D₅ a los 7 días. HE, 10x.

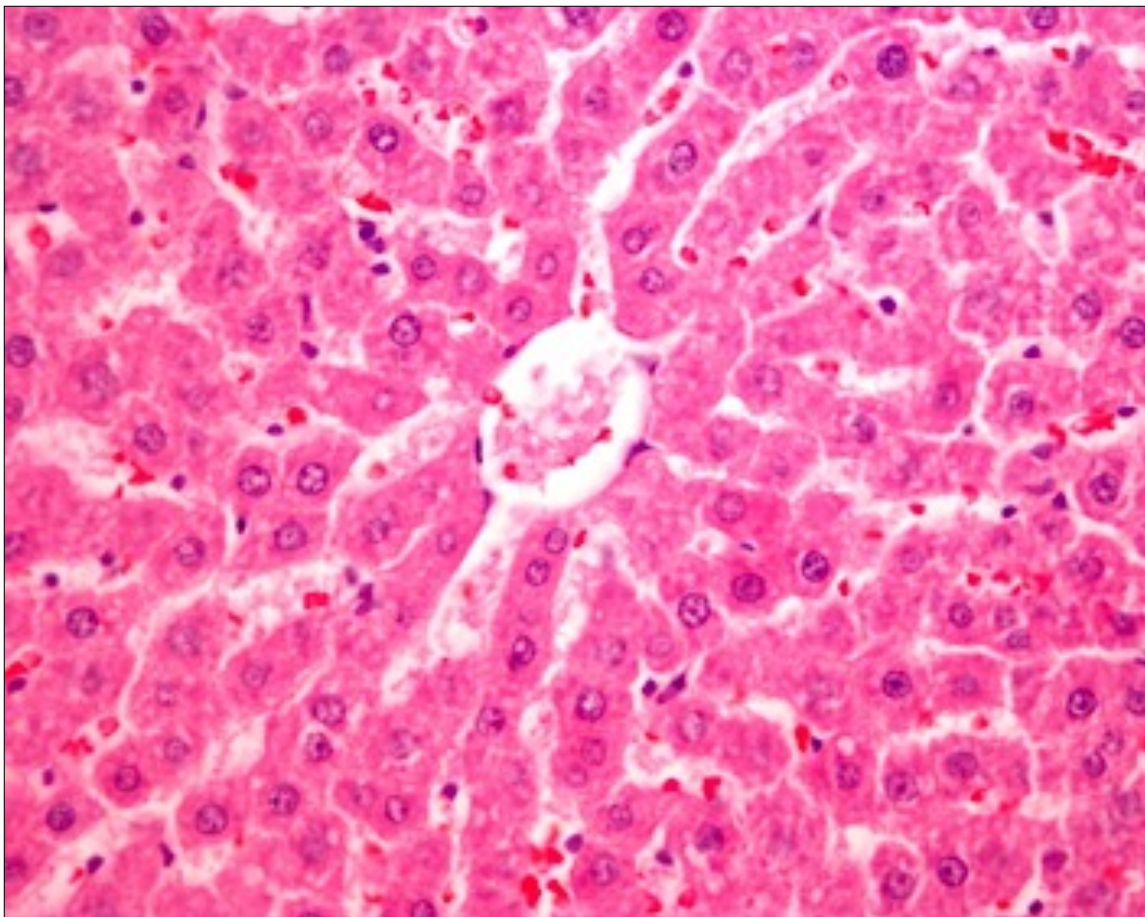


Figura 20. Histología hepática en grupo D₅ a los 7 días. HE, 40x.

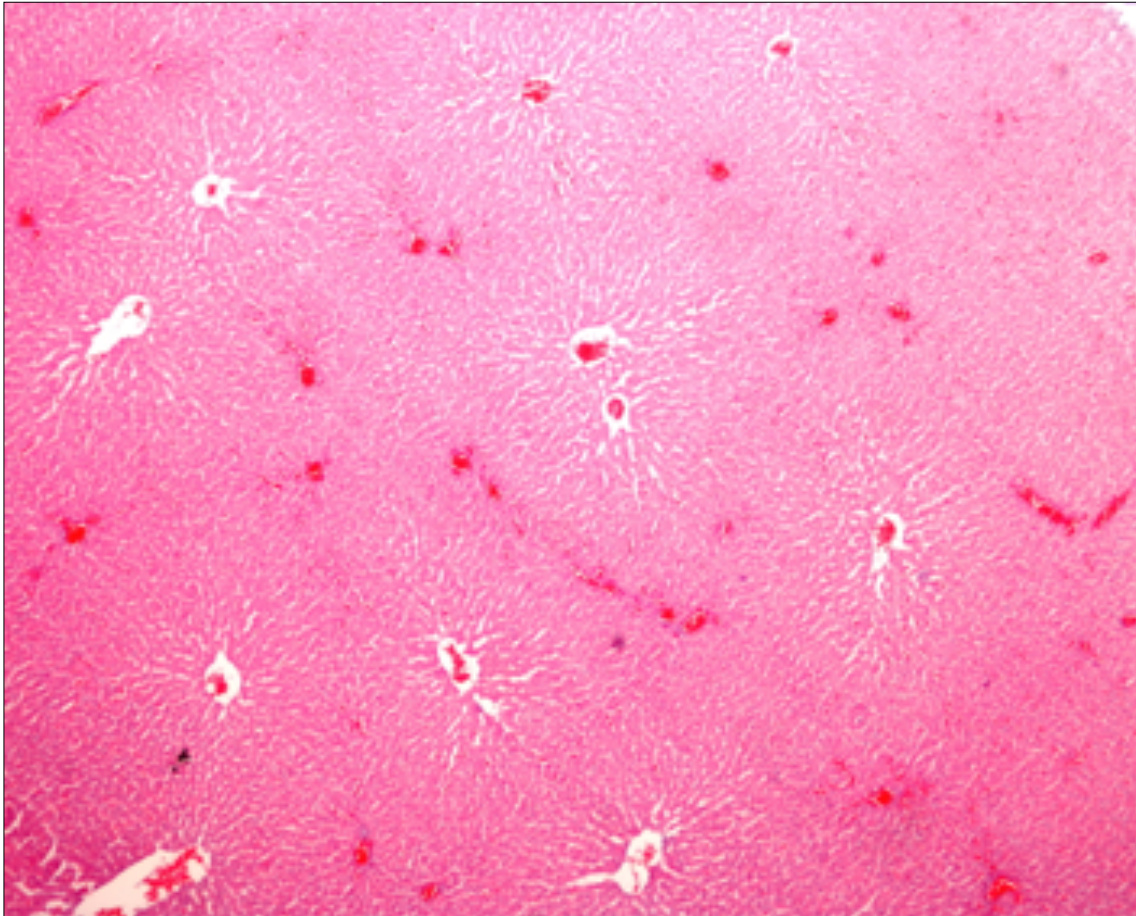


Figura 21. Histología hepática en grupo D₀ a los 7 días. HE, 10x.

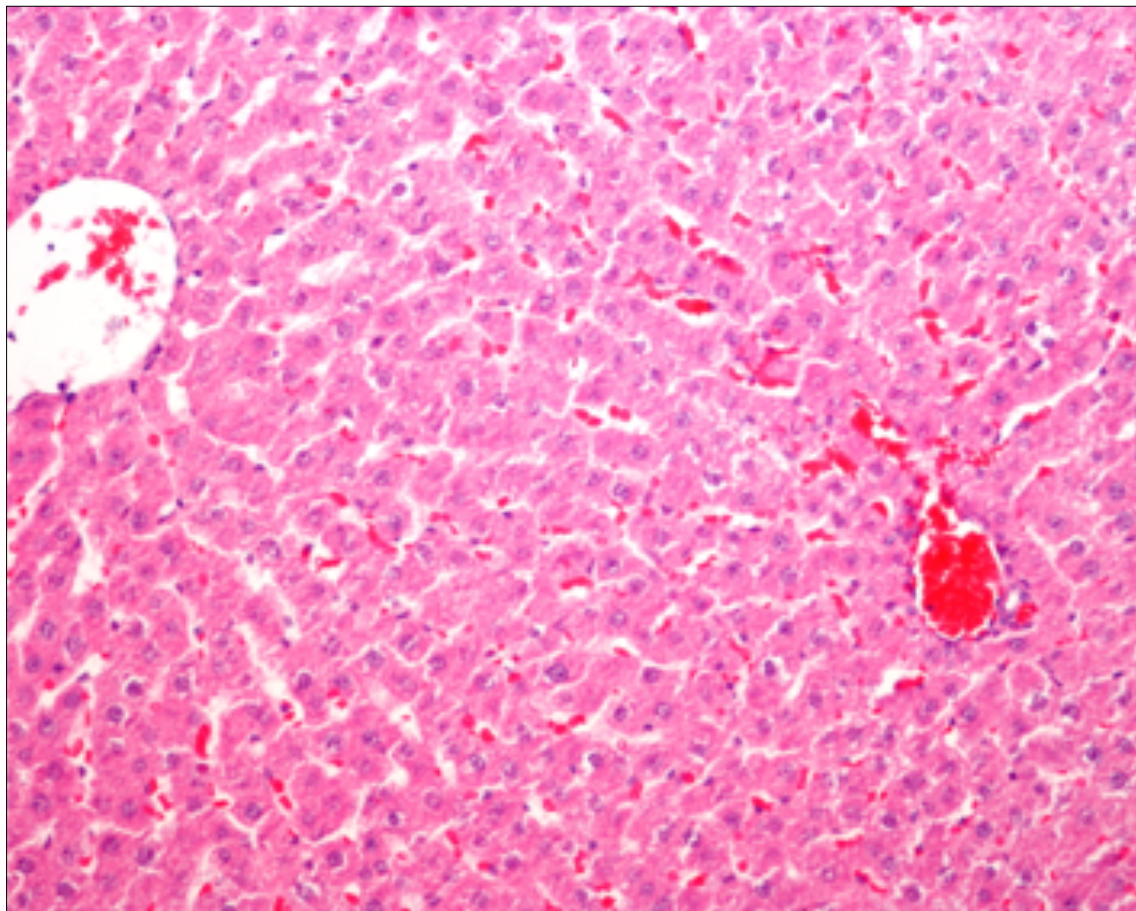


Figura 22. Histología hepática en grupo D₀ a los 7 días. HE, 40x.

5.2. Estudio de inducción de IHA con CCl₄ y tratamiento con ASCs

5.2.1. Análisis bioquímico

Análisis descriptivo

En la tabla 28 se presentan los valores de cada parámetro, para cada individuo y tiempo.

AST

La AST tiene un pico sérico máximo a las 24h en los dos grupos a los que se les inyecta CCl₄; en el grupo sin ASCs, la media es de 3.175,52 UI con un máximo de 19.883 UI y en el grupo con ASCs la media es de 3.974,17 UI con un máximo de 17.244 UI (tabla 29).

Este aumento disminuye progresivamente a lo largo del tiempo, hasta normalizarse a los 7 días. Los dos grupos control, con aceite y con ASCs, tienen en todo momento unos valores dentro del rango de referencia normal.

ALT

La ALT, de forma idéntica a la AST, tiene un pico sérico máximo a las 24h para los grupos a los que se les inyecta CCl₄ con un descenso progresivo hasta el séptimo día, en el que se normaliza, mientras que es normal en los grupos control (tabla 30).

Los valores medios y máximos, a las 24h, son 987,43 UI y 5.971 UI para el grupo sin ASCs y 1.036,62 UI y 3.605 UI para el grupo con ASCs, respectivamente.

5. RESULTADOS

FA

La FA, a diferencia de la ALT y AST, no tiene un incremento medio significativo respecto a su valor de referencia a las 24h, y solamente en el grupo de IHA con ASCs se eleva a las 48h (460,79 UI), normalizándose a los 7 días (tabla 31).

B_T

La B_T se eleva a las 24h únicamente en los grupos a los que se les induce IHA, alcanzando cifras de 1,86 mg/dL en el grupo sin ASCs y de hasta 3,62 mg/dL en el grupo tratado con ASCs, pero a las 48h, mientras que en el grupo sin ASCs comienza el descenso con cifras máximas de 0,72 mg/dL, en el grupo con ASCs se observa un nuevo incremento con valores plasmáticos máximos de hasta 4,16 mg/dL y un valor medio de 0,8447 mg/dL frente a 0,6417 mg/dL a las 24h (tabla 32). Los dos grupos control permanecen dentro de los valores de referencia normales.

5. RESULTADOS

	Tiempo Parámetro	24h				48h				7 días			
		AST	ALT	FA	B _T	AST	ALT	FA	B _T	AST	ALT	FA	B _T
Grupo Control 1 CCl ₄ n=15 4 exitos*	1	1360	556	229	0,3								
	2	1358	326	214	0,29								
	3	9217	3503	321	1,41								
	4	19883	5971	340	1,86								
	5	1612	575	207	0,33	1338	428	220	0,35				
	6	879	302	246	0,28	624	221	224	0,24				
	7	230	58	182	0,15	168	50	182	0,17				
	8	91	46	281	0,03	87	39	230	0,17				
	9	104	56	276	0,09	104	45	249	0,2	95	39	239	0,16
	10	750	286	241	0,26	597	213	212	0,2	89	46	250	0,14
	11	9663	5095	378	0,22	1205	1169	318	0,44	87	28	231	0,16
Grupo Control 2 CCl ₄ n=15 3 exitos#	1	3076	1103	326	0,45								
	2	14201	1473	314	1,01								
	3	1849	216	625	0,42	313	80	371	0,27				
	4	157	38	339	0,23	52	22	140	0,16				
	5	105	38	253	0,18	52	27	153	0,15				
	6	2146	333	421	0,46	347	119	248	0,29				
	7	215	74	289	0,27	105	41	222	0,18				
	8	100	44	370	0,11	85	39	275	0,13				
	9	150	51	450	0,21	133	49	271	0,02	69	36	187	0,15
	10	159	55	537	0,17	82	25	158	0,02	71	32	217	0,12
	11	2634	1039	478	0,99	2829	1076	459	0,72	73	26	170	0,15
	12	3098	1473	563	0,52	2111	1218	328	0,34	79	39	163	0,14

Tabla 28. Valores AST, ALT, FA y B_T de cada rata, según la dosis y el tiempo, en el grupo control con CCl₄ del estudio de IHA.

*Tres exitos se producen las primeras 24h y 1 uno a 48h, pero a la rata muerta a 48h tampoco se le pudo extraer sangre a 24h por coagulación de la muestra.

#Los tres exitos se producen en las primeras 24h.

5. RESULTADOS

AST							
Tiempo	Grupo	n	\bar{x}	σ	M_e	Mín.	Máx.
24h	0	15	107,07	22,154	99,00	73	146
	1	15	120,87	20,039	124,00	72	142
	2	23	3.175,52	5.157,778	1.358,00	91	19.883
	3	29	3.974,17	4.259,241	2.537,00	70	17.244
	Total	82	2.337,89	4.060,320	187,00	70	19.883
48h	0	10	124,70	33,089	120,50	85	198
	1	10	112,90	31,321	120,00	59	157
	2	17	601,88	814,026	168,00	52	2.829
	3	19	2.049,21	2.806,271	561,00	60	9.452
	Total	56	920,41	1.864,308	156,50	52	9.452
7d	0	5	125,20	23,573	114,00	101	151
	1	5	56,40	12,157	54,00	43	69
	2	7	80,43	10,048	79,00	69	95
	3	9	67,33	28,496	57,00	39	125
	Total	26	79,88	31,216	73,50	39	151

Tabla 29. AST, descriptores estadísticos de los grupos del estudio de inducción de IHA con CCl_4 y tratamiento con ASCs.

n = tamaño muestral; \bar{x} = media; σ = desviación estándar; M_e = mediana;

Mín = valor mínimo; Máx = valor máximo

0 = control aceite, 1 = control ASCs, 2 = CCl_4 , 3 = CCl_4 + ASCs

ALT							
Tiempo	Grupo	n	\bar{x}	σ	M_e	Mín.	Máx.
24h	0	15	34,13	3,980	34,00	28	39
	1	15	45,43	6,781	43,00	38	59
	2	23	987,43	1.640,315	302,00	38	5.971
	3	29	1.036,62	1.050,914	714,00	38	3.605
	Total	82	658,15	1.155,966	57,00	28	5.971
48h	0	10	35,40	7,834	32,00	28	51
	1	10	43,30	7,484	42,50	34	58
	2	17	285,94	427,883	50,00	22	1.218
	3	19	706,05	894,488	308,00	43	2.958
	Total	56	340,41	628,650	50,50	22	2.958
7d	0	5	39,20	3,564	38,00	36	43
	1	5	31,00	2,739	31,00	28	35
	2	7	35,14	6,986	36,00	26	46
	3	9	32,67	6,225	33,00	21	41
	Total	26	34,27	5,957	34,00	21	46

Tabla 30. ALT, descriptores estadísticos de los grupos del estudio de inducción de IHA con CCl_4 y tratamiento con ASCs.

n = tamaño muestral; \bar{x} = media; σ = desviación estándar; M_e = mediana;

Mín = valor mínimo; Máx = valor máximo

0 = control aceite, 1 = control ASCs, 2 = CCl_4 , 3 = CCl_4 + ASCs

5. RESULTADOS

FA							
Tiempo	Grupo	n	\bar{x}	σ	M_e	Mín.	Máx.
24h	0	15	308,40	107,001	304,00	166	488
	1	15	357,87	106,346	339,00	186	567
	2	23	342,61	120,250	321,00	182	625
	3	29	369,52	159,926	355,00	123	823
	Total	82	348,66	131,089	339,00	123	823
48h	0	10	372,40	87,785	351,00	271	516
	1	10	297,70	92,939	288,50	157	446
	2	17	250,59	82,499	230,00	140	459
	3	19	460,79	211,376	451,00	110	963
	Total	56	352,07	164,791	327,50	110	963
7d	0	5	355,60	66,594	328,00	295	455
	1	5	206,20	45,844	206,00	148	255
	2	7	208,14	34,749	217,00	163	250
	3	9	251,11	139,650	199,00	107	523
	Total	26	251,00	103,345	235,00	107	523

Tabla 31. FA, descriptores estadísticos de los grupos del estudio de inducción de IHA con CCl_4 y tratamiento con ASCs.

n = tamaño muestral; \bar{x} = media; σ = desviación estándar; M_e = mediana;

Mín = valor mínimo; Máx = valor máximo

0 = control aceite, 1 = control ASCs, 2 = CCl_4 , 3 = CCl_4 + ASCs

B_T							
Tiempo	Grupo	n	\bar{x}	σ	M_e	Mín.	Máx.
24h	0	15	0,1127	0,03150	0,1200	0,03	0,16
	1	15	0,1727	0,01223	0,1700	0,15	0,19
	2	23	0,4452	0,45237	0,2800	0,03	1,86
	3	29	0,6417	0,84646	0,3000	0,04	3,62
	Total	82	0,4040	0,59143	0,1800	0,03	3,62
48h	0	10	0,1190	0,02025	0,1150	0,10	0,17
	1	10	0,1570	0,01947	0,1600	0,12	0,19
	2	17	0,2382	0,16505	0,2000	0,02	0,72
	3	19	0,8447	1,22330	0,2900	0,10	4,16
	Total	56	0,4082	0,77411	0,1700	0,02	4,16
7d	0	5	0,1200	0,01871	0,1200	0,10	0,15
	1	5	0,1200	0,01414	0,1200	0,10	0,14
	2	7	0,1275	0,05312	0,1450	0,00	0,16
	3	9	0,1567	0,04243	0,1400	0,09	0,24
	Total	26	0,1344	0,04079	0,1400	0,00	0,24

Tabla 32. B_T , descriptores estadísticos de los grupos del estudio de inducción de IHA con CCl_4 y tratamiento con ASCs.

n = tamaño muestral; \bar{x} = media; σ = desviación estándar; M_e = mediana;

Mín = valor mínimo; Máx = valor máximo

0 = control aceite, 1 = control ASCs, 2 = CCl_4 , 3 = CCl_4 + ASCs

Análisis comparativo

Al comparar las variaciones de los niveles plasmáticos de AST a las 24h, 48h y 7 días entre los diferentes grupos — control con aceite, control con ASCs, CCl₄ y CCl₄ + ASCs —, se observa que las 24h existen diferencias significativas entre los grupos a los que se les administra el tóxico intraperitoneal y los dos grupos control. También se observa que no existen diferencias significativas entre los grupos de IHA con y sin tratamiento con ASCs a las 24h ($P= 0,279$), 48h ($P= 1,000$) y 7d ($P= 0,582$), (gráfica 6).

A las 48h y 7 días las diferencias entre los grupos con inducción de IHA y los grupos control alternan, siendo significativas a las 48h frente al grupo control de ASCs, pero no frente al grupo control con aceite de oliva y al contrario al realizar el análisis a los 7 días.

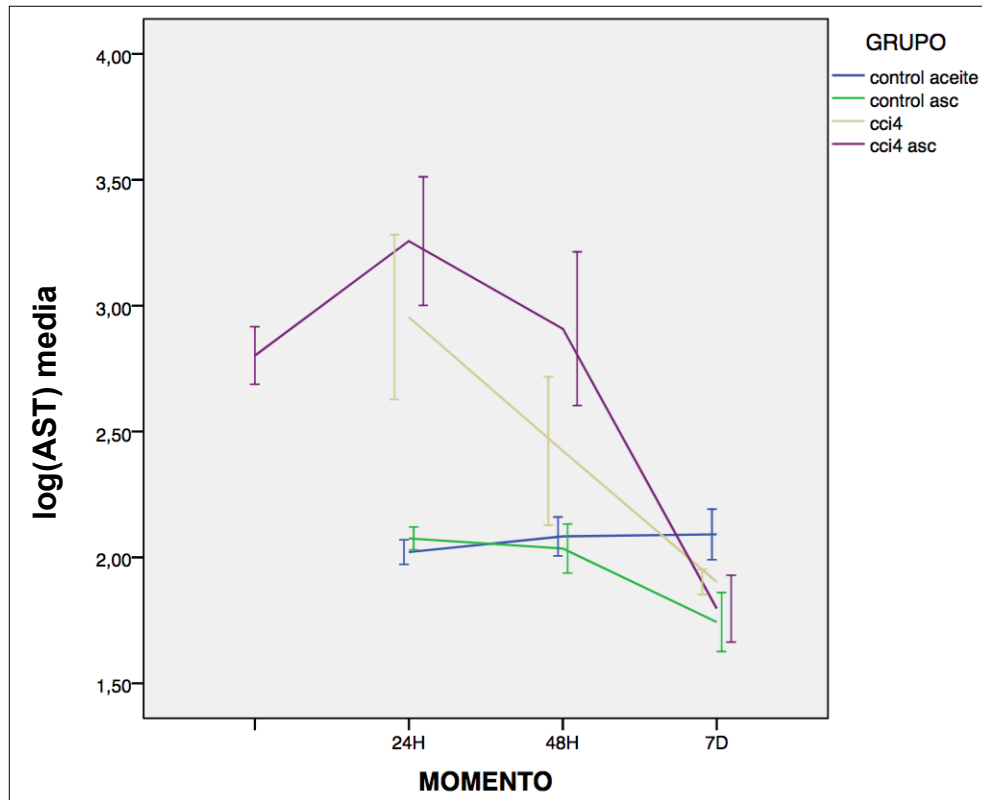
Respecto a los niveles de ALT, sólo existen diferencias significativas a las 24h y 48h entre los dos grupos de IHA inducida y los grupos control, no existiendo diferencias en ningún momento entre los grupos de IHA, con o sin ASCs, ni entre los grupos control y ninguna diferencia tampoco entre ninguno de los cuatro grupos a los 7 días (gráfica 7).

La FA, a las 24h, no muestra diferencias significativas entre ninguno de los grupos estudiados y a los 7 días, únicamente el grupo control con aceite, presenta unos valores elevados que difieren, tanto del otro grupo control con ASCs como del grupo de IHA sin ASCs.

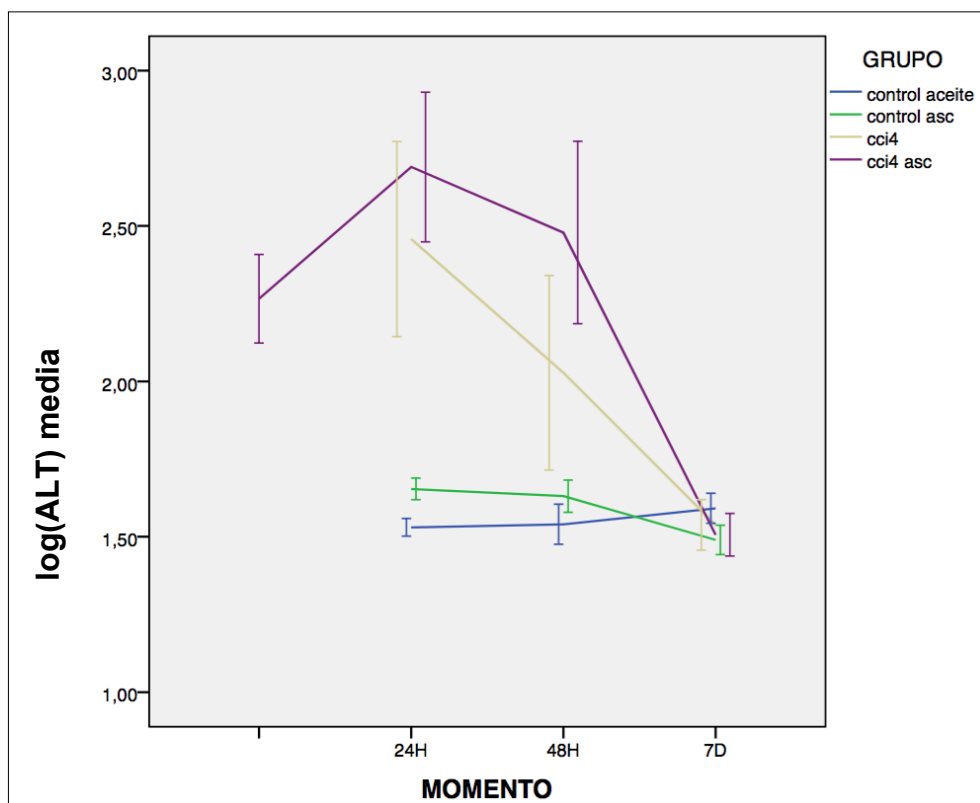
A las 48h, sí existen diferencias entre los dos grupos de IHA ($P=0,003$), con unos niveles séricos de FA medios mayores en el grupo tratado con ASCs con respecto al grupo de CCl₄ sin células madre mesenquimales (gráfica 8).

En cuanto al análisis de la B_T, aunque existe una clara tendencia en el grupo de IHA con ASCs a presentar valores medios de B_T superiores al resto de grupos a las 48h, no existen diferencias significativas entre los grupos, a excepción del grupo control de aceite respecto al grupo de CCl₄ asociado a ASCs a las 24h, siendo inferiores las cifras de B_T plasmáticas en el primero (gráfica 9).

5. RESULTADOS

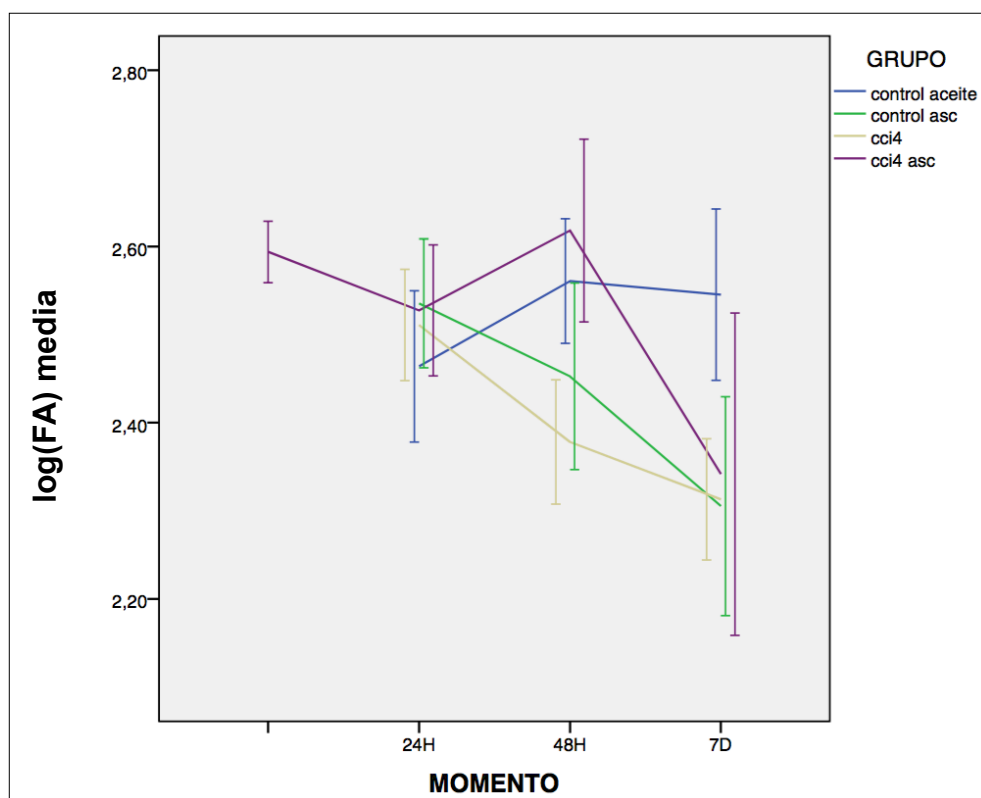


Gráfica 6. Niveles plasmáticos medios de AST, representados mediante su transformación logarítmica, y con intervalos de confianza del 95%.

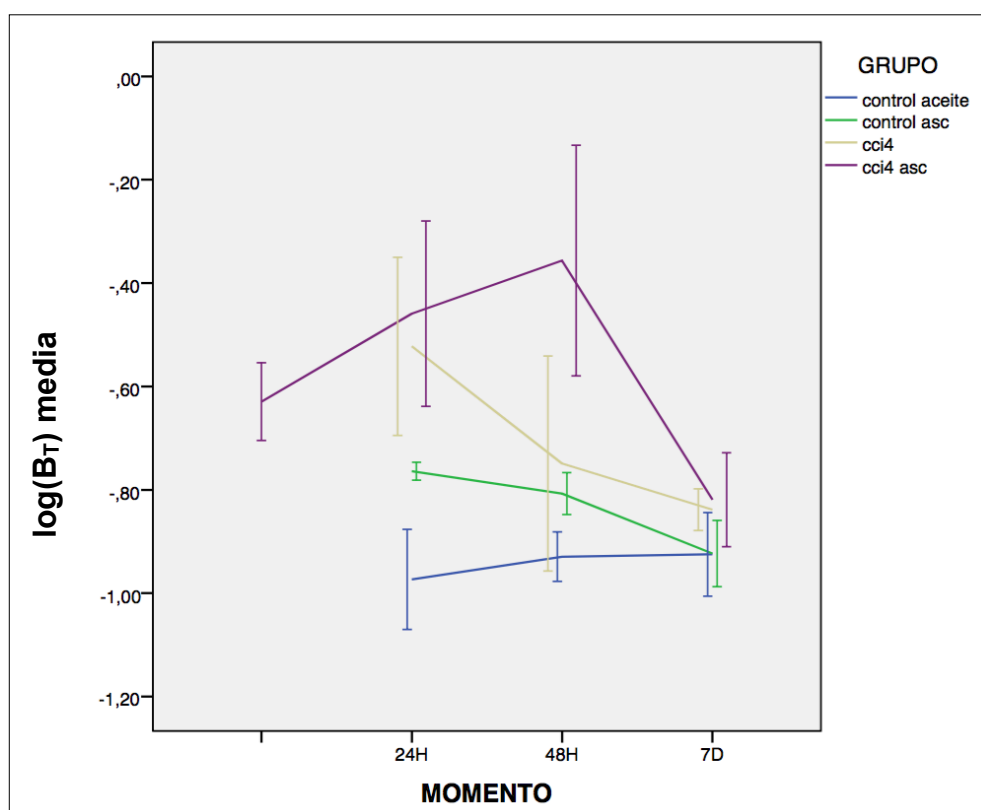


Gráfica 7. Niveles plasmáticos medios de ALT, representados mediante su transformación logarítmica, y con intervalos de confianza del 95%.

5. RESULTADOS



Gráfica 8. Niveles plasmáticos medios de FA, representados mediante su transformación logarítmica, y con intervalos de confianza del 95%.



Gráfica 9. Niveles plasmáticos medios de B_T, representados mediante su transformación logarítmica, y con intervalos de confianza del 95%.

5.2.2. Análisis histopatológico

El análisis histopatológico con tinción de HE del grupo control con aceite y del grupo de IHA sin ASCs, es idéntico al descrito en el apartado 5.1.2.

Al examinar las muestras de tejido hepático provenientes del grupo de tratamiento con ASCs después de la inducción de IHA con CCl₄, en vez de una necrosis hepática grado III-IV en el 100% de las muestras, observamos a las 24h (figuras 23 y 24) un espectro variable de grados de necrosis, que nos permite establecer 3 cohortes o grupos:

Un primer grupo de muestras son prácticamente normales, con arquitectura del parénquima hepático conservada, espacios porta sin alteraciones histológicas, y sin presencia de fibrosis, infiltrado inflamatorio, ni alteraciones hepatocitarias; hallazgos equivalentes al grupo control.

Un segundo grupo de muestras presenta cambios floridos, similares a los encontrados en el grupo de IHA con CCl₄ a las 24h. En este grupo, la arquitectura del parénquima está conservada, existe intenso infiltrado inflamatorio en zona 3 perivenular con necrosis hepatocitaria confluyente (grado III-IV), esteatosis microvacuolar en el parénquima hepático y presencia de células balonizadas frecuentes, localizadas predominantemente en zona 3 perivenular.

Y un tercer y último grupo de muestras con cambios intermedios entre los hallazgos de los dos grupos anteriormente descritos; arquitectura conservada, ligero – moderado infiltrado inflamatorio perivenular con necrosis aislada (grado I-II) y sin que se observe la presencia de células balonizadas ni fibrosis.

A las 48h, el tejido hepático presenta una mayor inflamación que a las 24h, pero observándose un grado de necrosis similar, también de localización perivenular y células vacuoladas en cantidad variable con arquitectura conservada (figuras 25 y 26).

A los 7 días, el parénquima hepático presenta arquitectura conservada, sin alteraciones histológicas en los espacios porta y sin fibrosis ni infiltrado inflamatorio significativos (figuras 27 y 28).

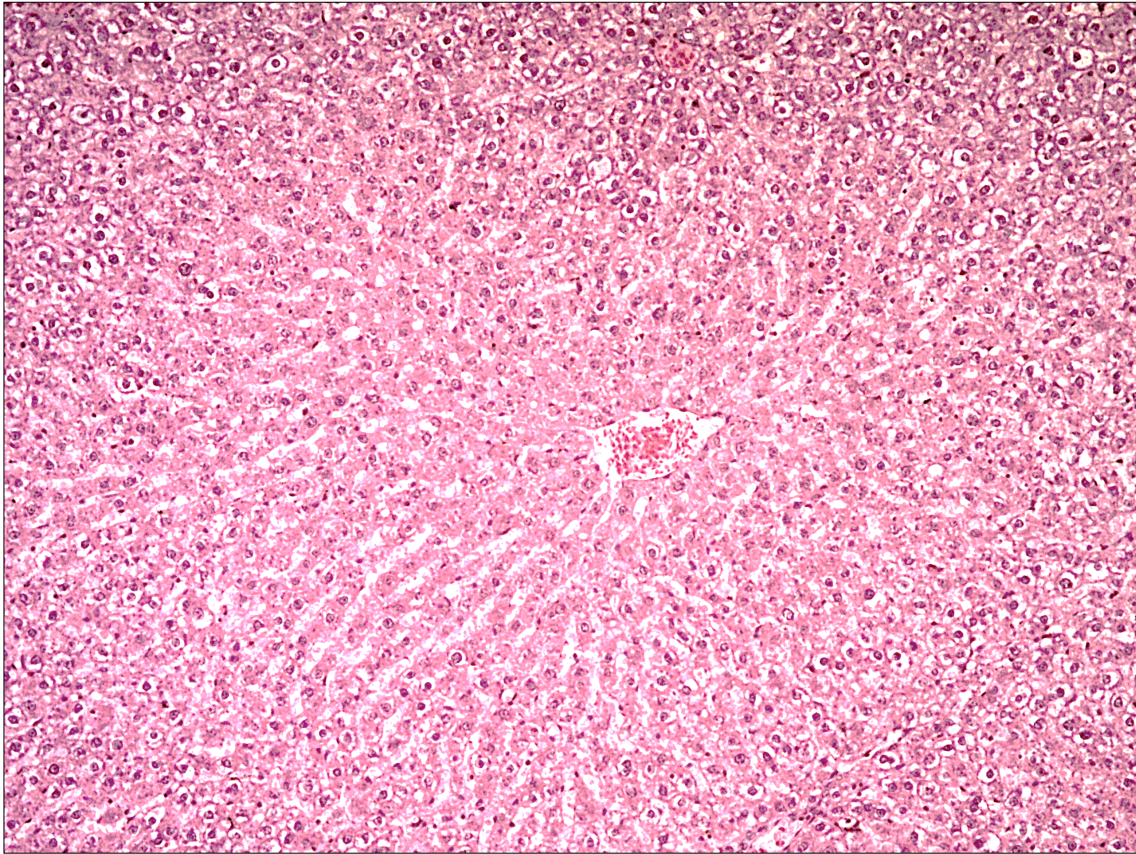


Figura 23. Histología hepática en grupo CCl₄ + ASCs a las 24h. HE, 10x.

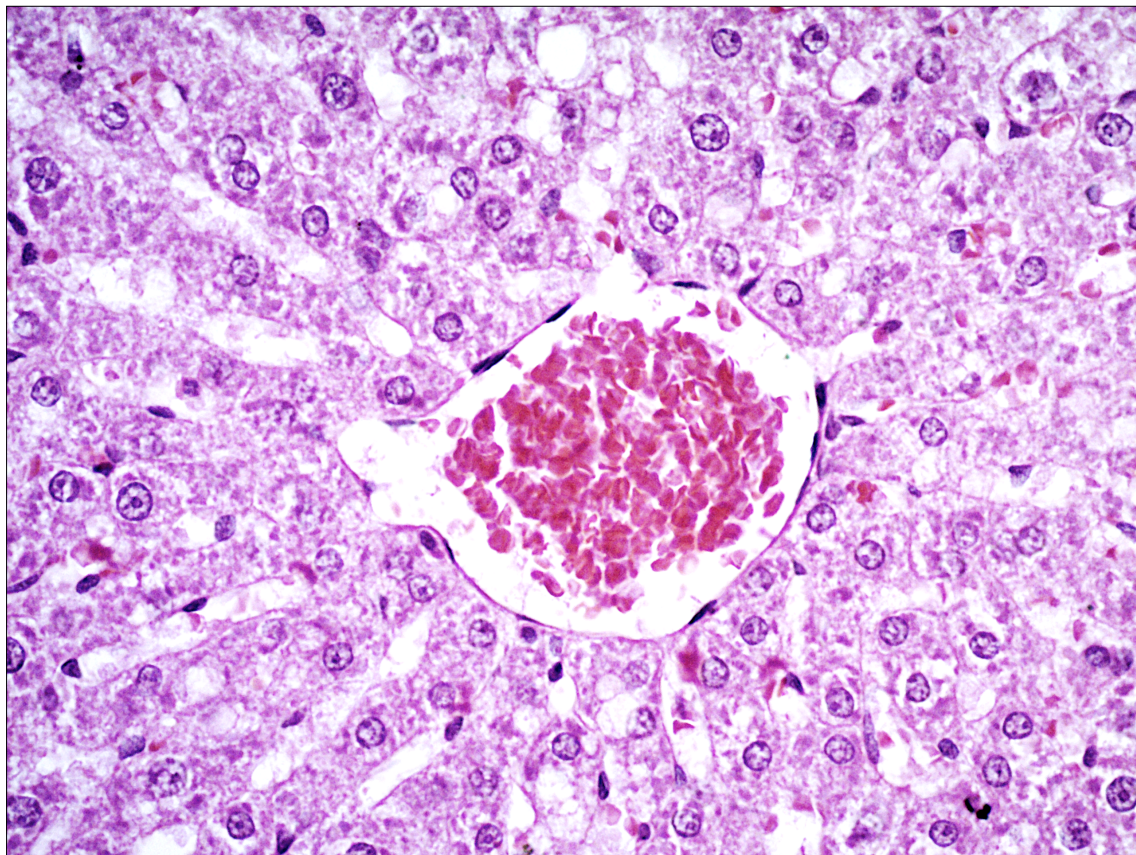


Figura 24. Histología hepática en grupo CCl₄ + ASCs a las 24h. HE, 40x.

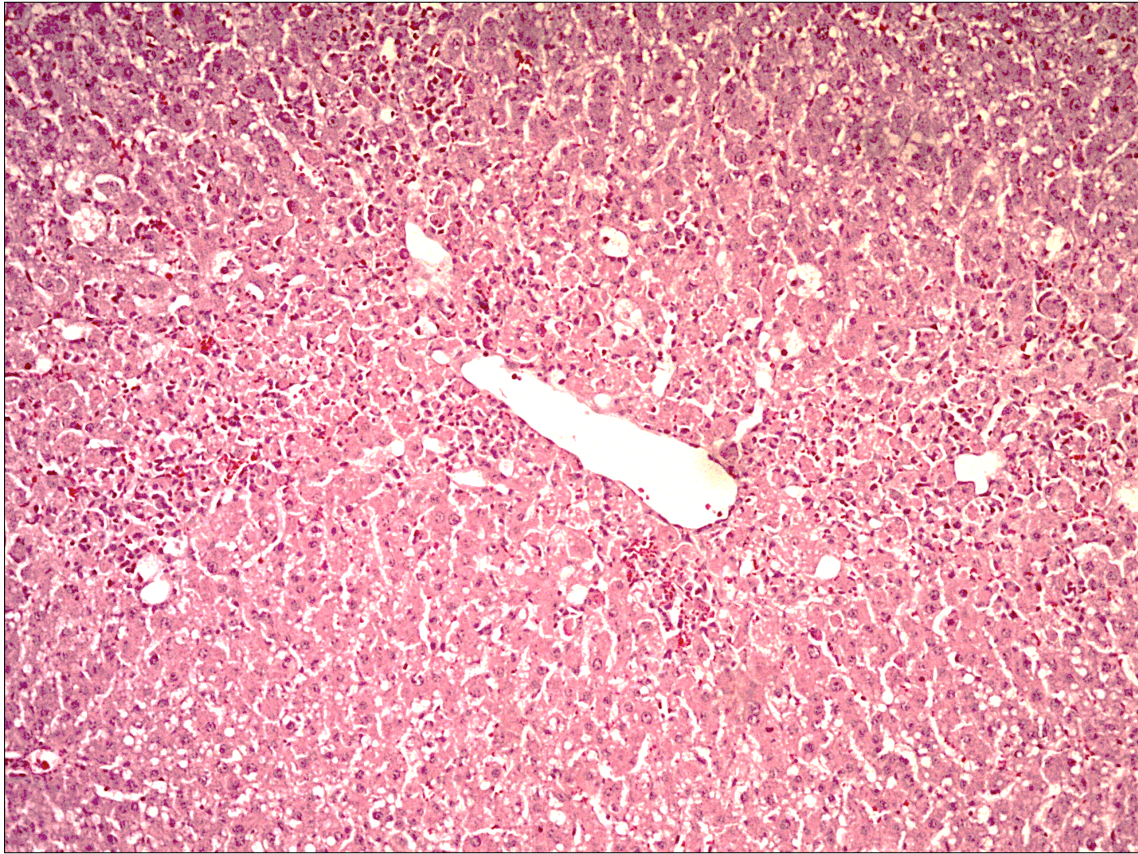


Figura 25. Histología hepática en grupo CCl_4 + ASCs a las 48h. HE, 10x.

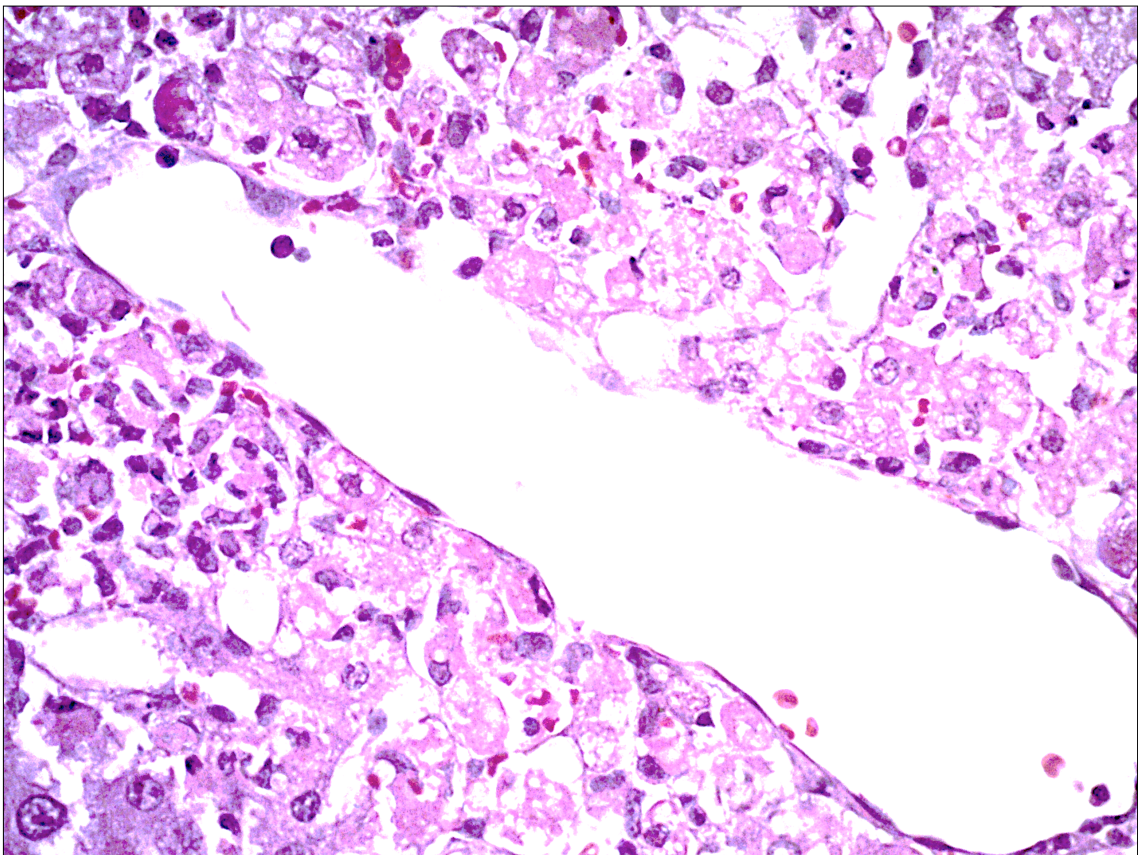


Figura 26. Histología hepática en grupo CCl_4 + ASCs a las 48h. HE, 40x.

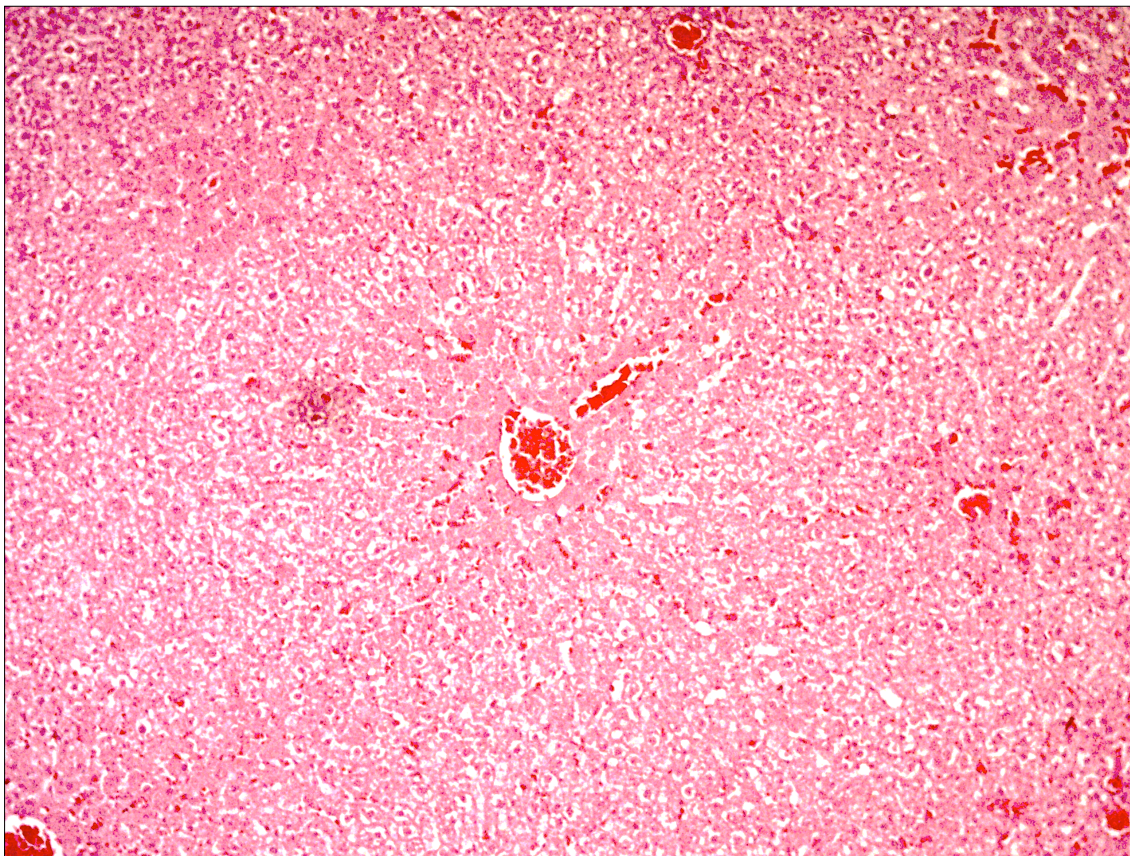


Figura 27. Histología hepática en grupo CCl₄ + ASCs a los 7 días. HE, 10x.

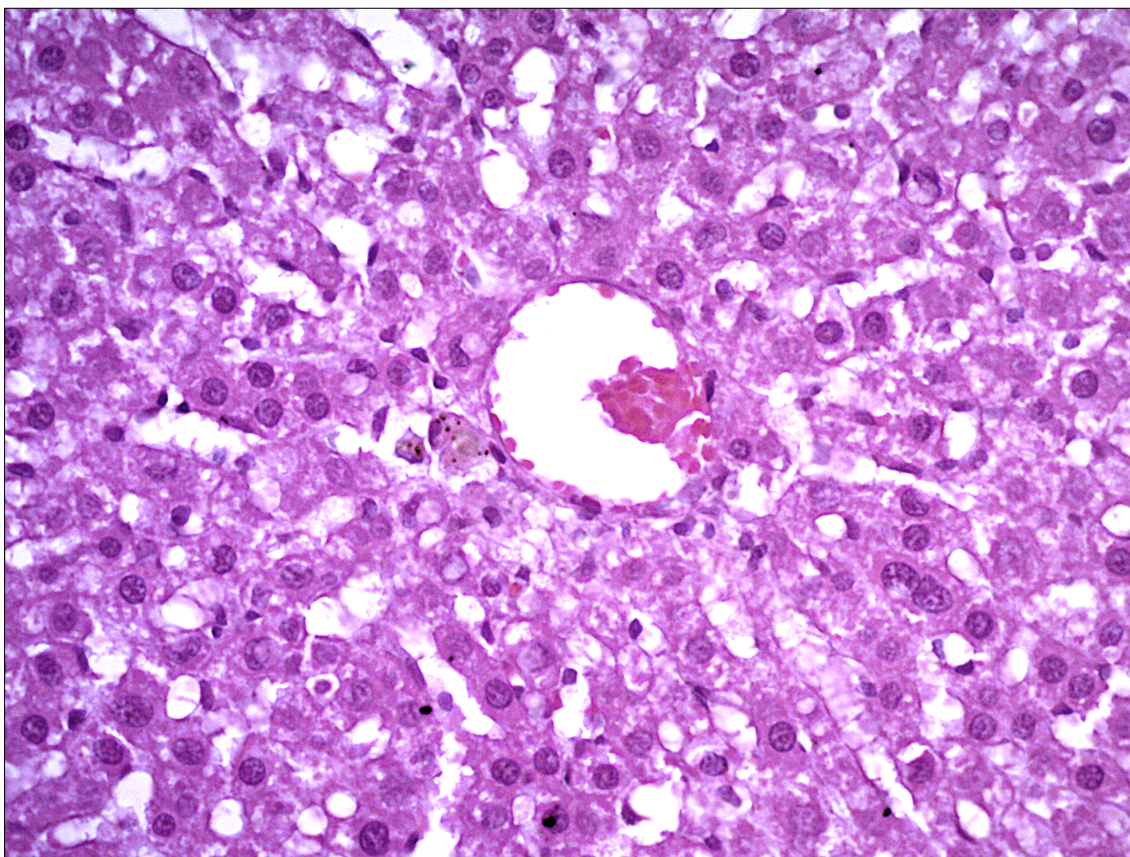


Figura 28. Histología hepática en grupo CCl₄ + ASCs a los 7 días. HE, 40x.

5.2.3. Mortalidad

La mortalidad en el grupo de ratas tratadas con CCl_4 es de un 23,33%, con un total de 7 *exitus letalis*, de los cuales, 6 son en las primeras 24h y 1 a las 48h. Sin embargo, la mortalidad en el grupo de ratas al que se le administró ASCs después de la inyección de CCl_4 , presenta una mortalidad del 3,33%, con un único evento letal a las 24h postinyección del tóxico, con diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($P = 0,026$; tabla 33).

En la gráfica 10 se representa la supervivencia de cada grupo a lo largo del tiempo mediante el análisis de curvas de Kaplan-Meier, observándose cómo el grupo con IHA y tratado con ASCs se diferencia del resto, mostrando una supervivencia mayor que el resto.

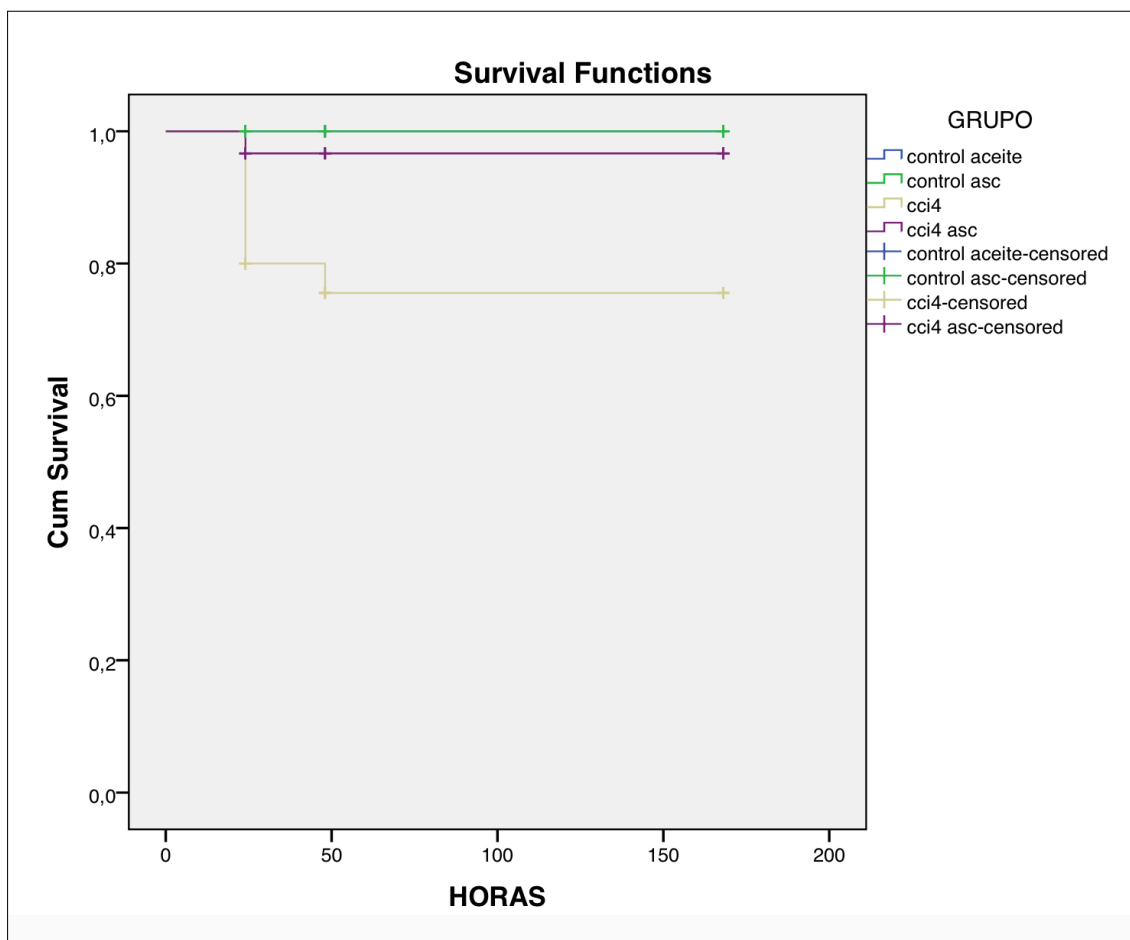
En las necropsias se comprueba que la causa de la muerte, en todos los casos, es consecuencia directa de la toxicidad hepática.

En los grupos control de aceite y ASCs, no hubo mortalidad.

GRUPO	Control Aceite		Control ASCs		CCl_4		$\text{CCl}_4 + \text{ASCs}$	
	Chi-Sq	Sig	Chi-Sq	Sig	Chi-Sq	Sig	Chi-Sq	Sig
Control Aceite			.	.	3,937	,047	,500	,480
Control ASCs	.	.			3,937	,047	,500	,480
CCl_4	3,937	,047	3,937	,047			4,985	,026
$\text{CCl}_4 + \text{ASCs}$,500	,480	,500	,480	4,985	,026		

Tabla 33. Log-Rank test (Mantel-Cox); análisis estadístico de la supervivencia.

5. RESULTADOS



Gráfica 10. Curvas de Kaplan-Meier; análisis estadístico de la supervivencia.

5.3. Estudio de la ruta celular y evaluación cuantitativa del número de ASCs

Se extraen pulmones, bazo e hígado a 24h, 48h y 7 días de las ratas sacrificadas en el grupo control de ASCs y en el grupo de IHA inducida tras la administración de CCl₄ y posterior inyección de ASCs y se analizan con microscopía de fluorescencia, para localizar y realizar un recuento del número de ASCs marcadas con PKH26, según se ha descrito en el apartado de material y métodos.

En la tabla 34 se describe por órgano, tiempo y grupo la media, desviación estándar, mediana y rango del número de células encontradas. En la gráfica 11 se representa, por órgano, el número de células en función del tiempo.

El número de ASCs halladas en el hígado de las ratas del grupo control (ASCs), y que por tanto, no han sufrido fallo hepático, es 0 a las 24h y 48h y tendente a 0 a los 7d.

Sin embargo, en los hígados de las ratas a las que les hemos inducido un fallo hepático agudo con CCl₄, sí encontramos la presencia de ASCs, de hasta 15 células por campo.

Como observamos en la tabla 35, que representa el análisis estadístico comparativo del número de ASCs halladas en hígado, entre el grupo control con ASCs y el grupo de IHA con ASCs, según la técnica de Bonferroni para análisis de modelos mixtos, la diferencia entre ambos grupos es significativa ($P=0,000$).

En las figuras 29 a 34 observamos la presencia de ASCs marcadas con PKH26 (membrana celular marcada en rojo) en el hígado de las ratas del grupo de IHA inducida, mientras que observamos la ausencia de las mismas en el grupo control.

Además, la localización de las ASCs es perivenular, coincidente con los focos de mayor lesión histológica provocados por el CCl₄.

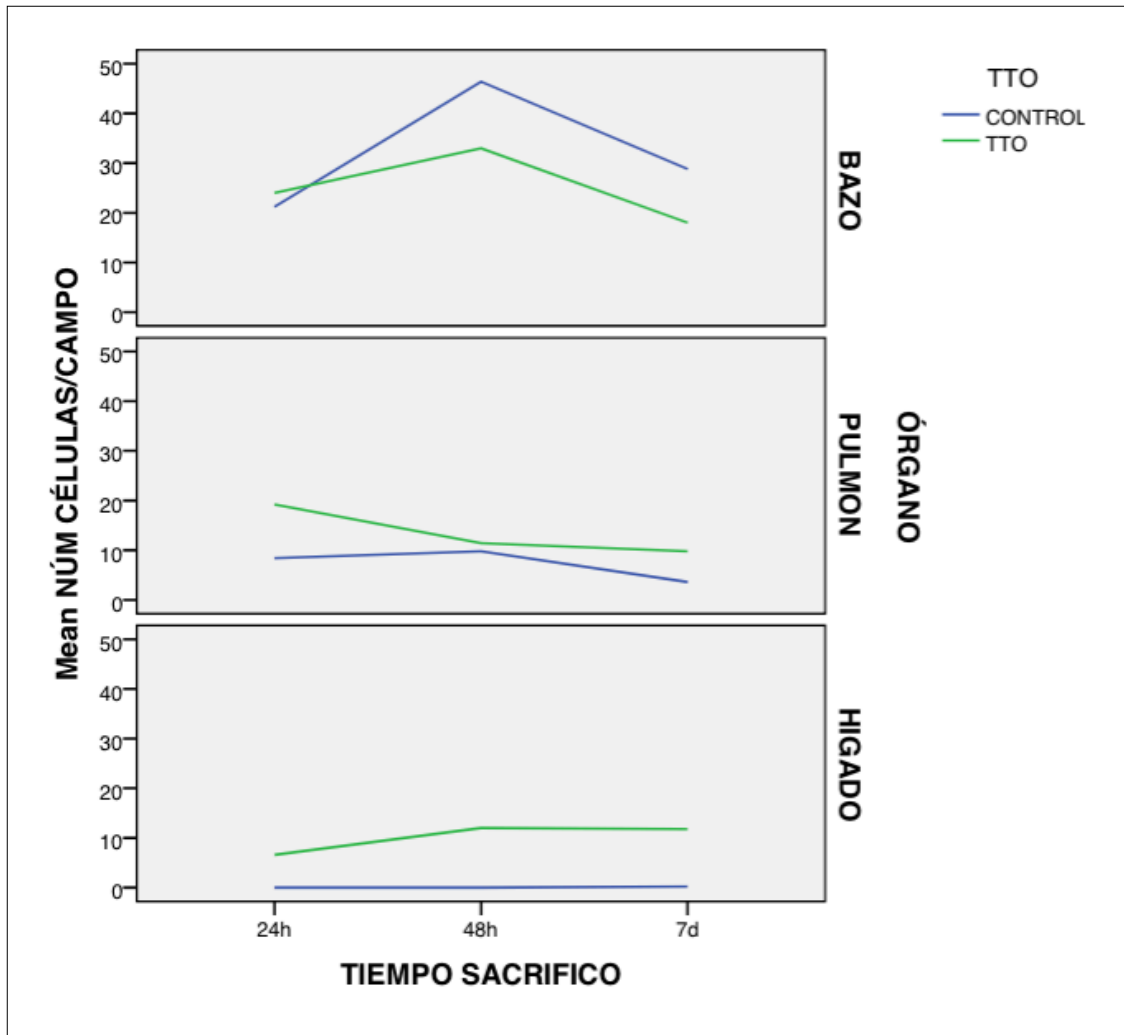
Las figuras 35 a 40 son fotografías obtenidas de las muestras de pulmón y las figuras 41 a 46 de bazo a 24h, 48h y 7 días de los grupos, control e IHA, con ASCs marcadas con PKH26, con objetivo de 40x aumentos.

5. RESULTADOS

Órgano	Tiempo	Grupo	n	\bar{x}	σ	M_e	Mín.	Máx.
BAZO	24h	ASCs	5	21,20	2,588	22,00	18	24
		CCl ₄ + ASCs	5	24,00	9,138	21,00	16	38
		Total	10	22,60	6,501	21,50	16	38
	48h	ASCs	5	46,40	14,588	46,00	31	63
		CCl ₄ + ASCs	5	33,00	5,788	31,00	28	41
		Total	10	39,70	12,623	35,00	28	63
	7d	ASCs	5	28,80	8,075	25,00	22	41
		CCl ₄ + ASCs	5	18,00	7,550	17,00	9	29
		Total	10	23,40	9,312	22,50	9	41
	Total	ASCs	15	32,13	14,167	25,00	18	63
		CCl ₄ + ASCs	15	25,00	9,509	28,00	9	41
		Total	30	28,57	12,398	26,50	9	63
PULMÓN	24h	ASCs	5	8,40	3,362	9,00	4	12
		CCl ₄ + ASCs	5	19,20	13,103	17,00	0	32
		Total	10	13,80	10,665	11,50	0	32
	48h	ASCs	5	9,80	2,387	10,00	7	13
		CCl ₄ + ASCs	5	11,40	7,266	10,00	6	24
		Total	10	10,60	5,168	10,00	6	24
	7d	ASCs	5	3,60	2,074	4,00	1	6
		CCl ₄ + ASCs	5	9,80	4,658	10,00	3	15
		Total	10	6,70	4,715	5,50	1	15
	Total	ASCs	15	7,27	3,693	7,00	1	13
		CCl ₄ + ASCs	15	13,47	9,403	10,00	0	32
		Total	30	10,37	7,695	9,50	0	32
HÍGADO	24h	ASCs	5	0,00	0,000	0,00	0	0
		CCl ₄ + ASCs	5	6,60	4,159	7,00	1	11
		Total	10	3,30	4,448	0,50	0	11
	48h	ASCs	5	0,00	0,000	0,00	0	0
		CCl ₄ + ASCs	5	12,00	2,121	12,00	10	15
		Total	10	6,00	6,481	5,00	0	15
	7d	ASCs	5	0,20	0,447	0,00	0	1
		CCl ₄ + ASCs	5	11,80	2,490	12,00	8	14
		Total	10	6,00	6,342	4,50	0	14
	Total	ASCs	15	0,07	0,258	0,00	0	1
		CCl ₄ + ASCs	15	10,13	3,833	11,00	1	15
		Total	30	5,10	5,774	1,00	0	15

Tabla 34. Descriptores estadísticos del número de ASCs por órgano, tiempo y grupo.

5. RESULTADOS



Gráfica 11. Número medio de ASCs en función del tiempo y órgano en los grupos control e IHA. CONTROL = Control ASCs; TTO = CCl₄ + ASCs.

Tiempo	Grupos		Diferencia media	Error estándar	Grados libertad	Sig.	IC 95% límite inferior	IC 95% límite superior
24h	ASCs	CCl ₄ + ASCs	-6,600	1,270	20	0,000	-9,248	-3,952
	CCl ₄ + ASCs	ASCs	6,600	1,270	20	0,000	3,952	9,248
48h	ASCs	CCl ₄ + ASCs	-12,000	1,270	20	0,000	-14,648	-9,352
	CCl ₄ + ASCs	ASCs	12,000	1,270	20	0,000	9,352	14,648
7d	ASCs	CCl ₄ + ASCs	-11,600	1,270	20	0,000	-14,248	-8,952
	CCl ₄ + ASCs	ASCs	11,600	1,270	20	0,000	8,952	14,248

Tabla 35. Análisis comparativo entre el grupo control y el grupo de IHA del número de ASCs en hígado. Sig. = significación.

5. RESULTADOS

Tiempo	Grupos		Diferencia media	Error estándar	Grados libertad	Sig.	IC 95% límite inferior	IC 95% límite superior
24h	ASCs	CCl ₄ + ASCs	-2.800	5,530	24	0,617	-14,213	8,613
	CCl ₄ + ASCs	ASCs	2.800	5,530	24	0,617	-8,613	14,213
48h	ASCs	CCl ₄ + ASCs	13.400	5,530	24	0,023	1,987	24,814
	CCl ₄ + ASCs	ASCs	-13.400	5,530	24	0,023	-24,814	-1,987
7d	ASCs	CCl ₄ + ASCs	10.800	5,530	24	0,063	-0,613	22,213
	CCl ₄ + ASCs	ASCs	-10.800	5,530	24	0,063	-22,213	0,613

Tabla 36. Análisis comparativo entre el grupo control y el grupo de IHA del número de ASCs en bazo. Sig. = significación.

Tiempo	Grupos		Diferencia media	Error estándar	Grados libertad	Sig.	IC 95% límite inferior	IC 95% límite superior
24h	ASCs	CCl ₄ + ASCs	-10.800	3,956	20	0,013	-19,052	-2,548
	CCl ₄ + ASCs	ASCs	10.800	3,956	20	0,013	2,548	19,052
48h	ASCs	CCl ₄ + ASCs	-1.600	3,956	20	0,690	-9,852	6,652
	CCl ₄ + ASCs	ASCs	1.600	3,956	20	0,690	-6,652	9,852
7d	ASCs	CCl ₄ + ASCs	-6.200	3,956	20	0,133	-14,452	2,052
	CCl ₄ + ASCs	ASCs	6.200	3,956	20	0,133	-2,052	14,452

Tabla 37. Análisis comparativo entre el grupo control y el grupo de IHA del número de ASCs en pulmón. Sig. = significación.

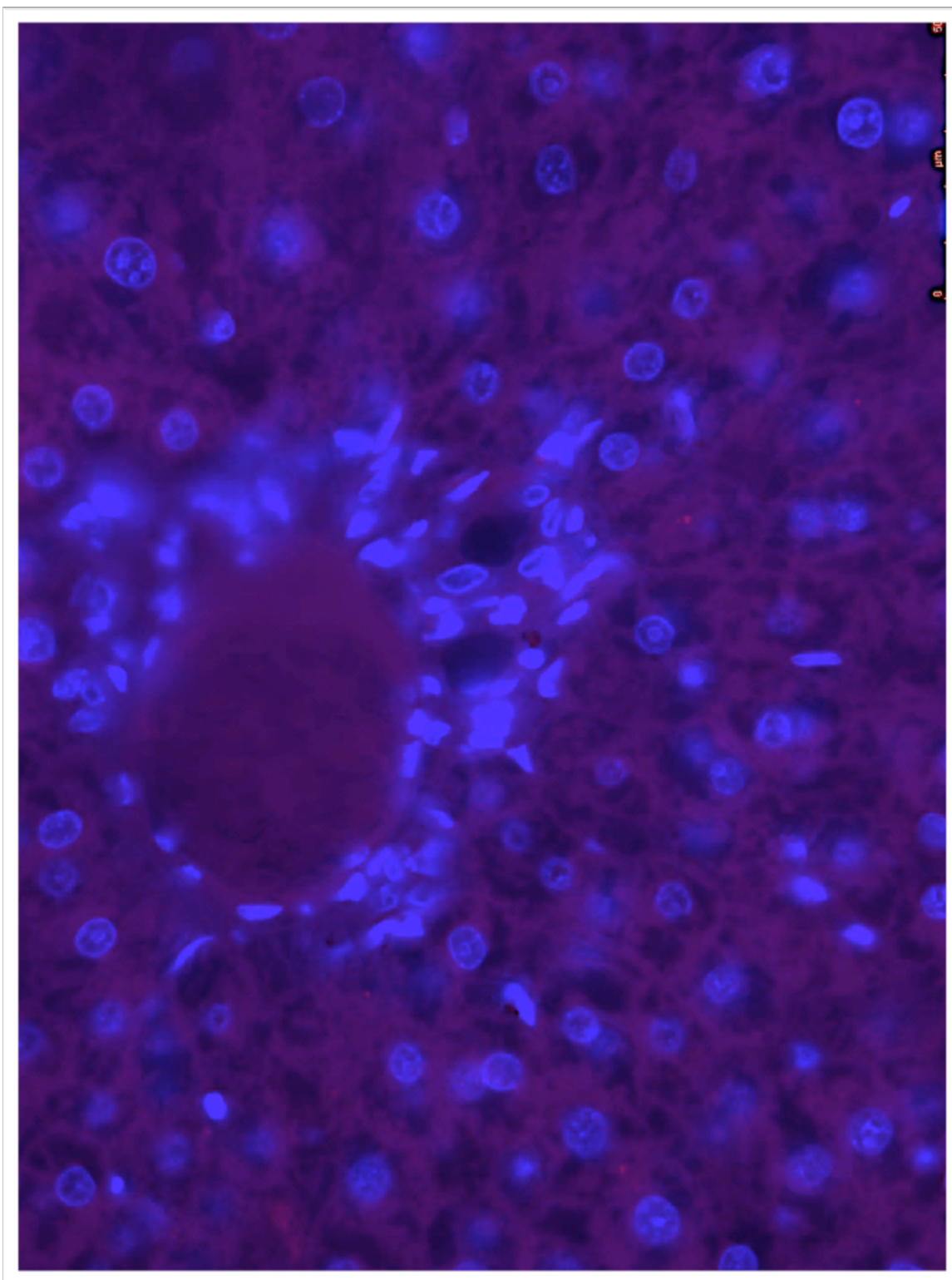


Figura 29. Hígado a 24h, grupo ASCs; tinción con PKH26.

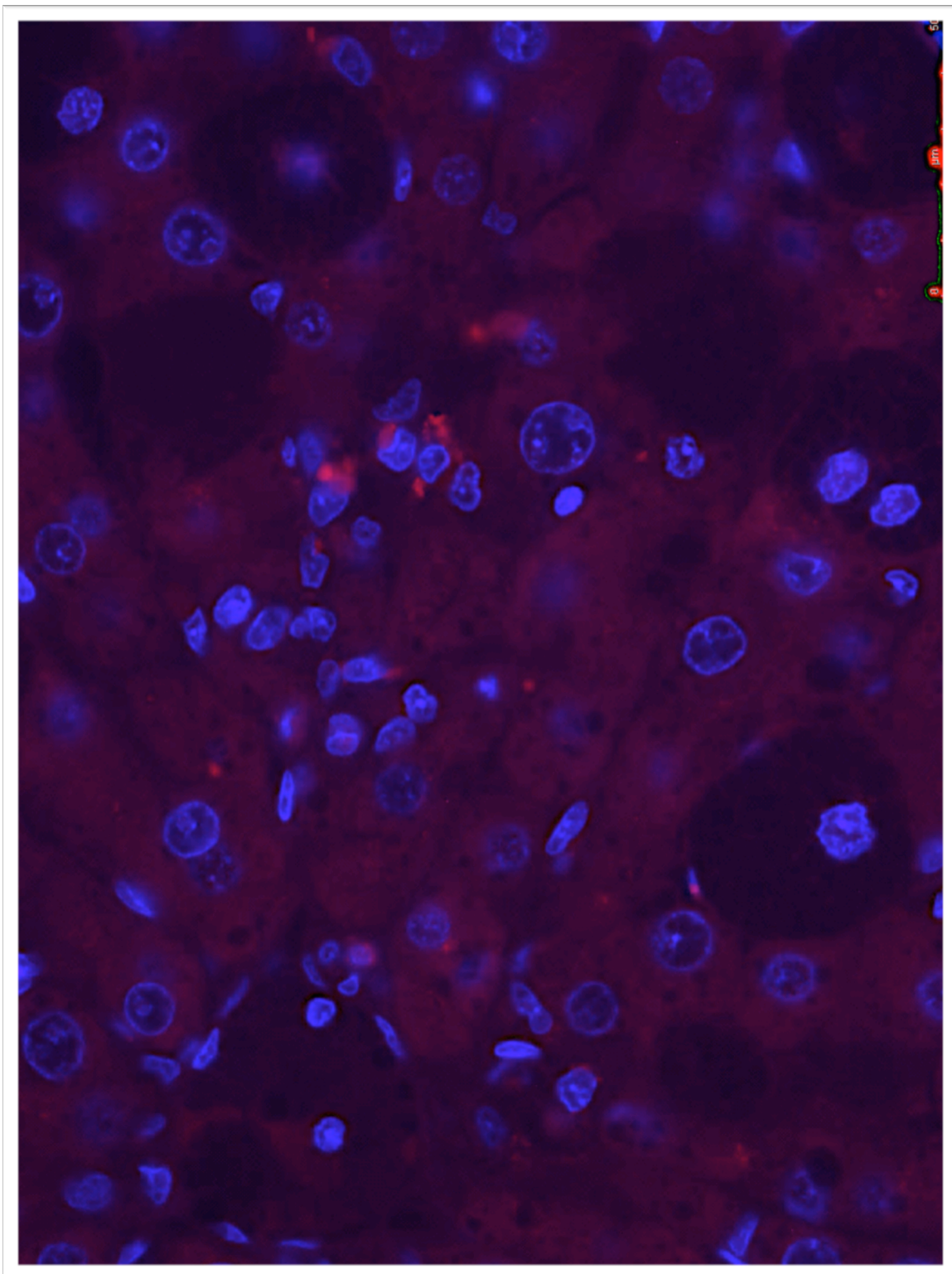


Figura 30. Hígado a 24h, grupo CCl₄ + ASCs; tinción con PKH26.

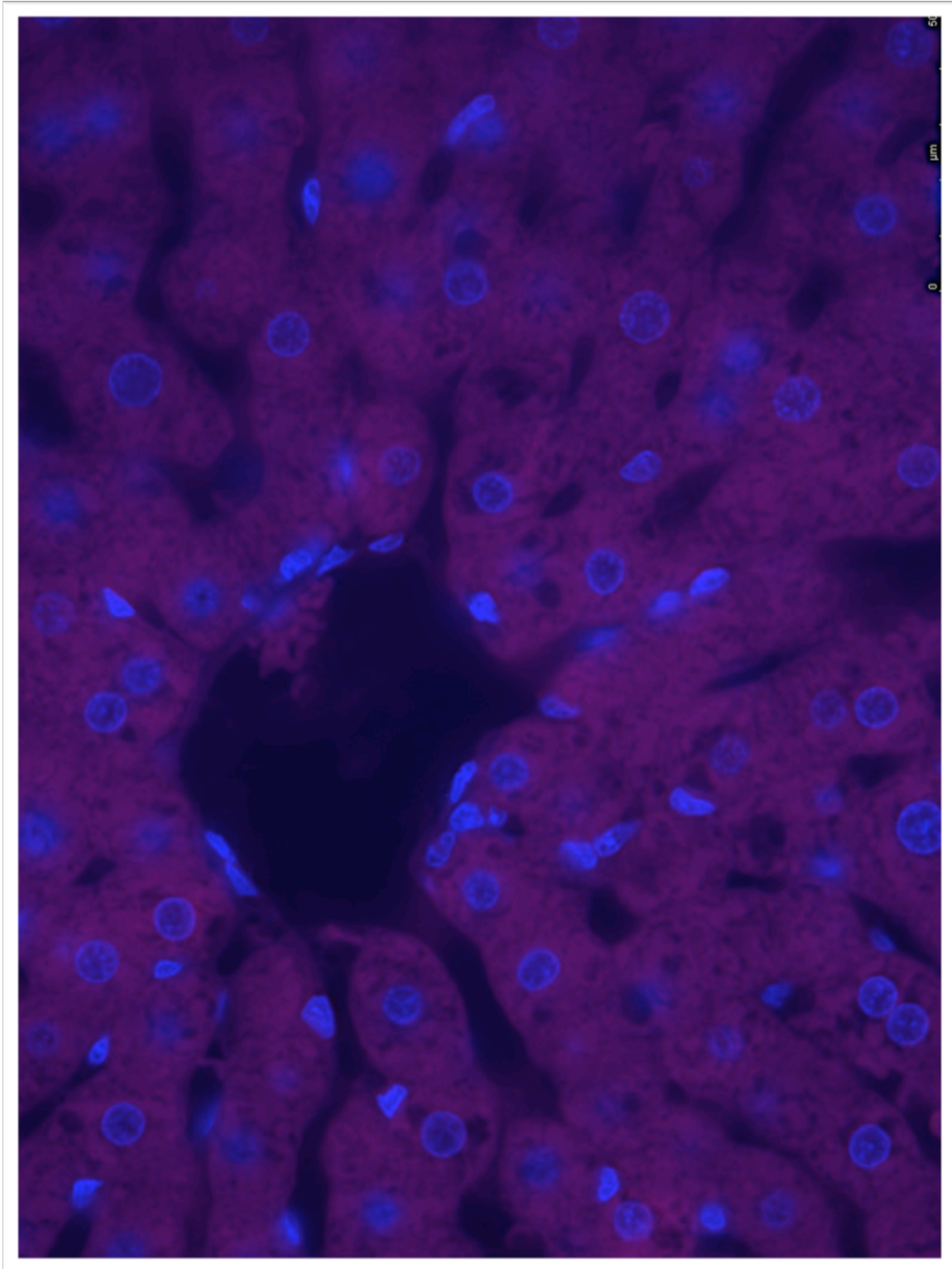


Figura 31. Hígado a 48h, grupo ASCs; tinción con PKH26.

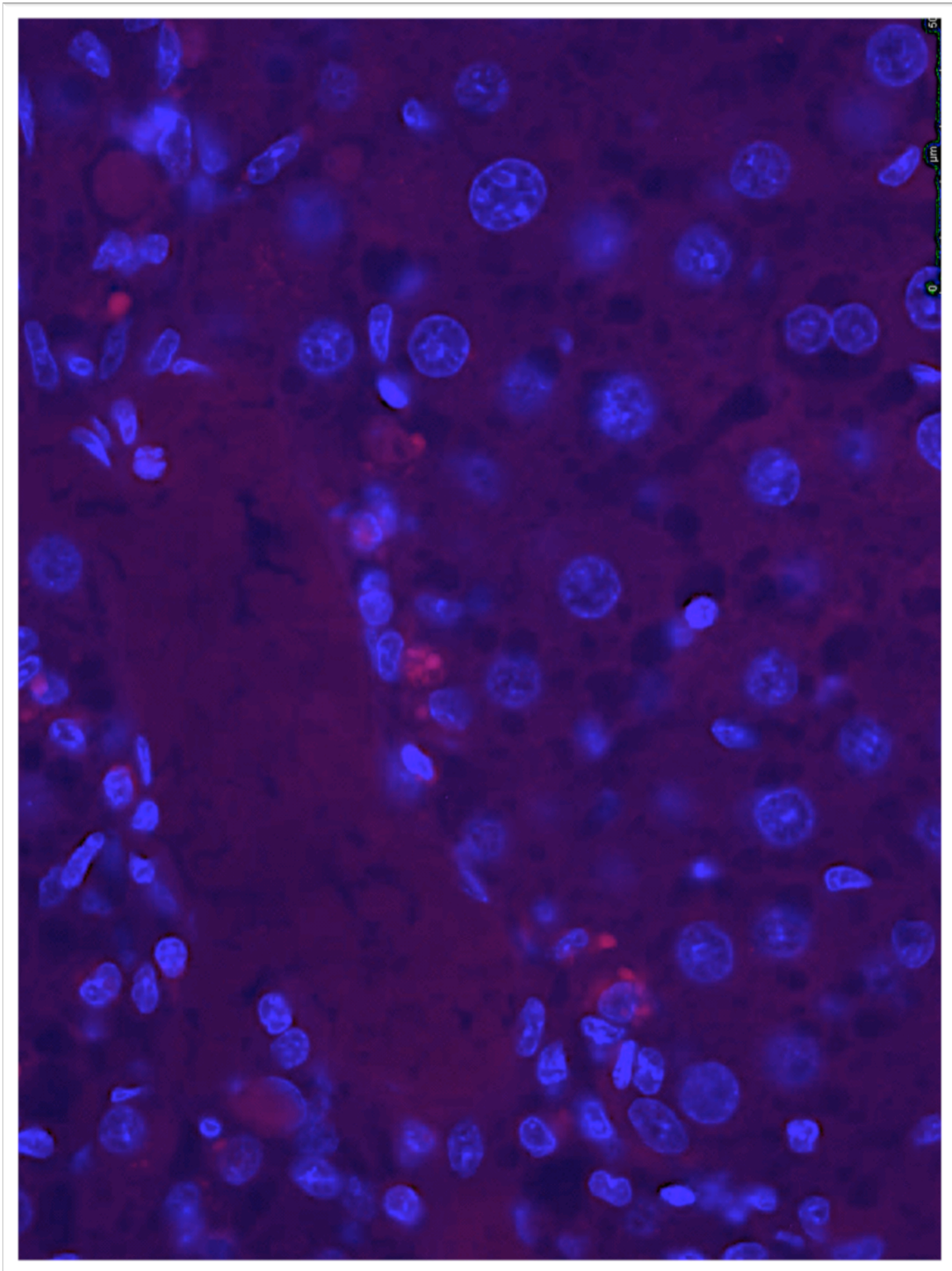


Figura 32. Hígado a 48h, grupo CCl₄ + ASCs; tinción con PKH26.

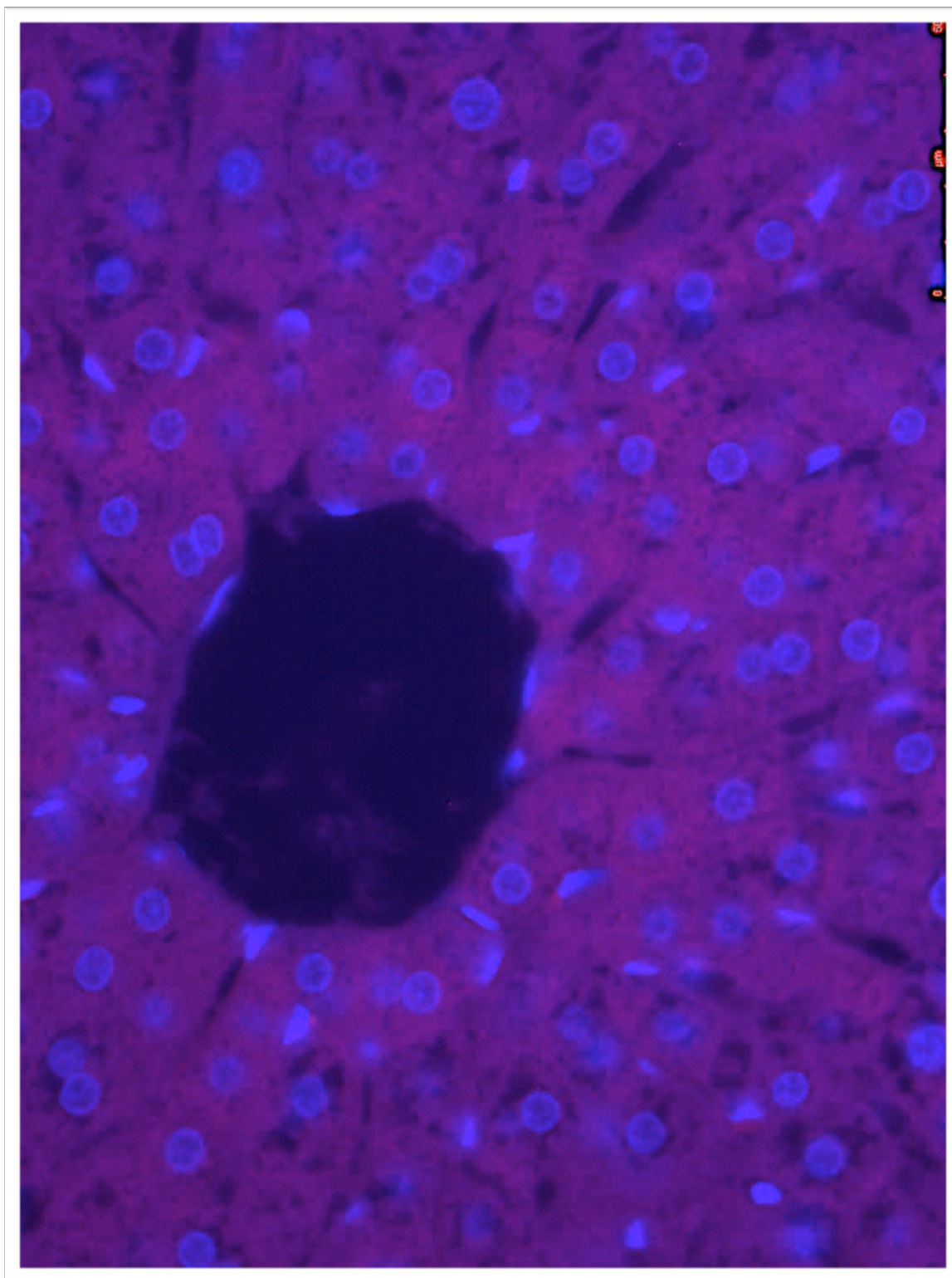


Figura 33. Hígado a 7 días, grupo ASCs; tinción con PKH26.

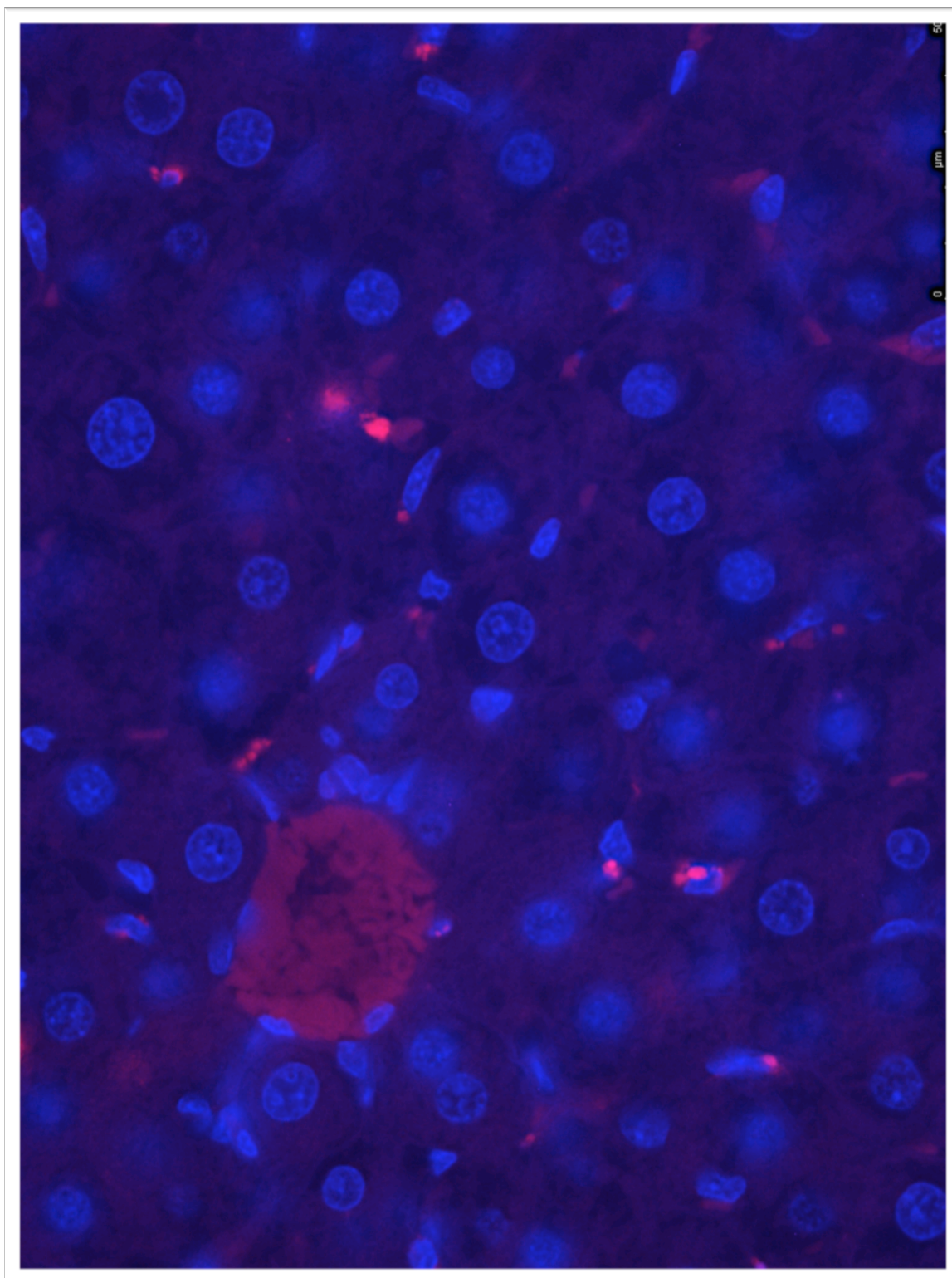


Figura 34. Hígado a 7 días, grupo CCl_4 + ASCs; tinción con PKH26.

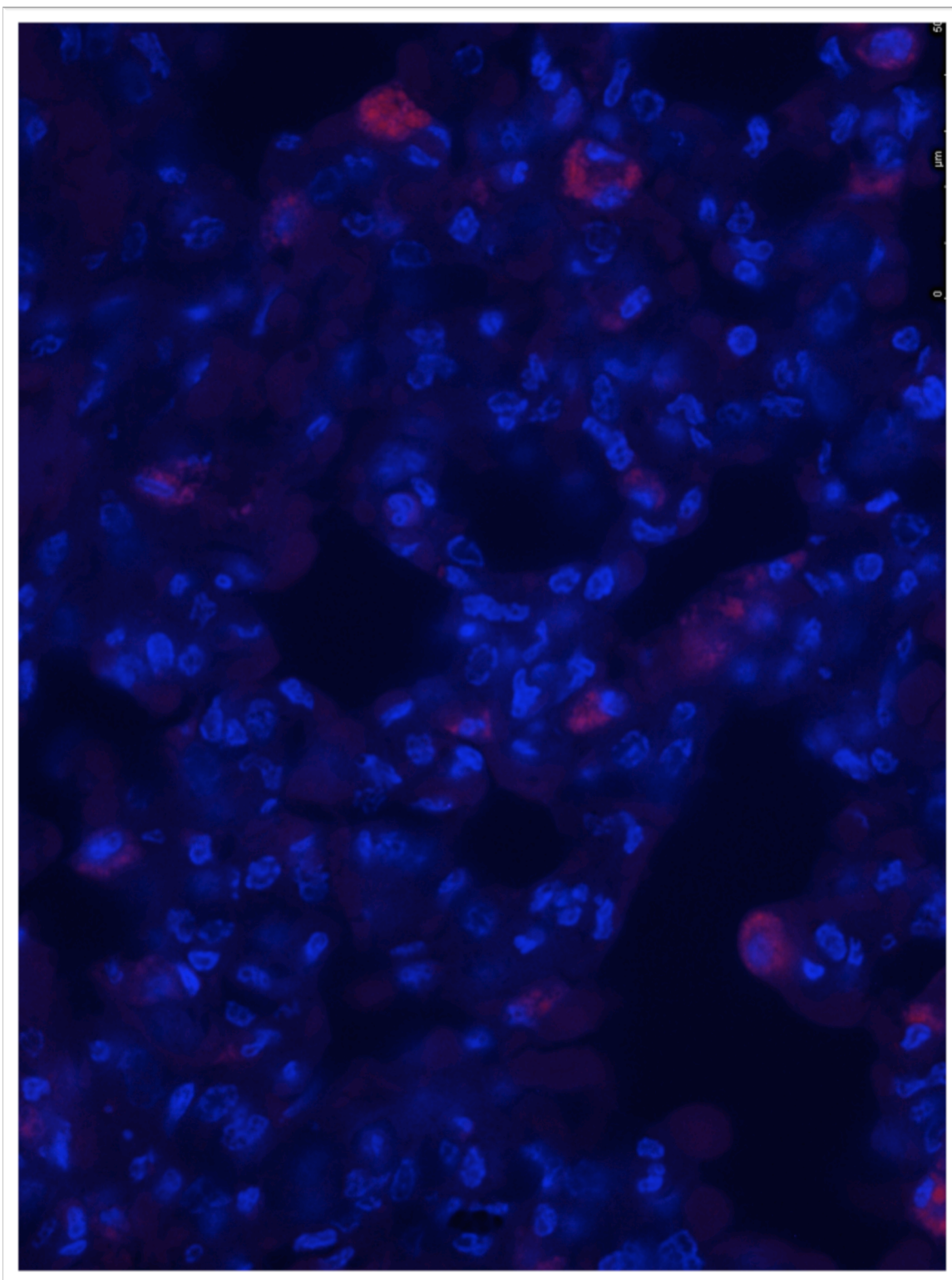


Figura 35. Pulmón a 24h, grupo ASCs; tinción con PKH26.

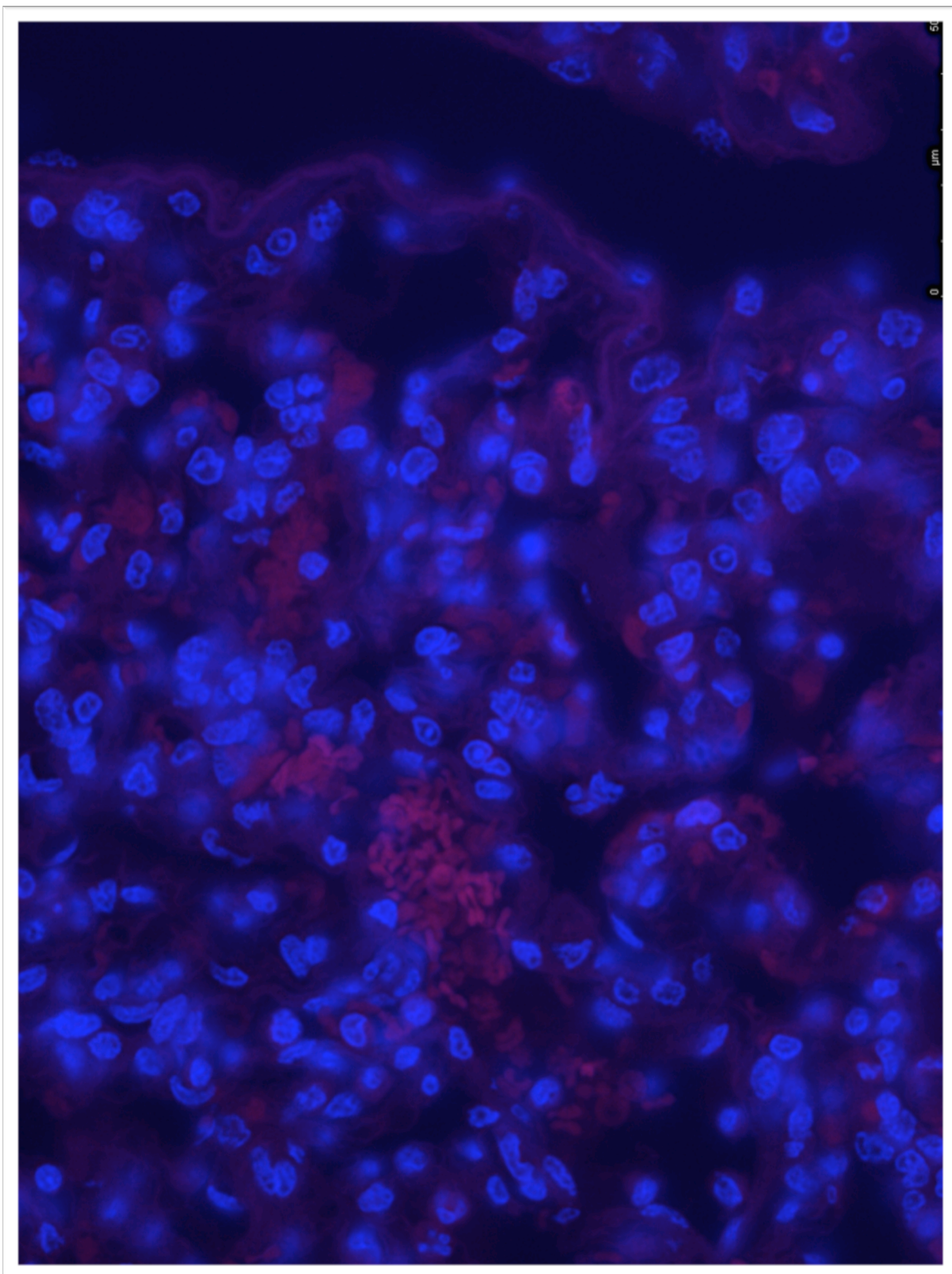


Figura 36. Pulmón a 24h, grupo CCl_4 + ASCs; tinción con PKH26.

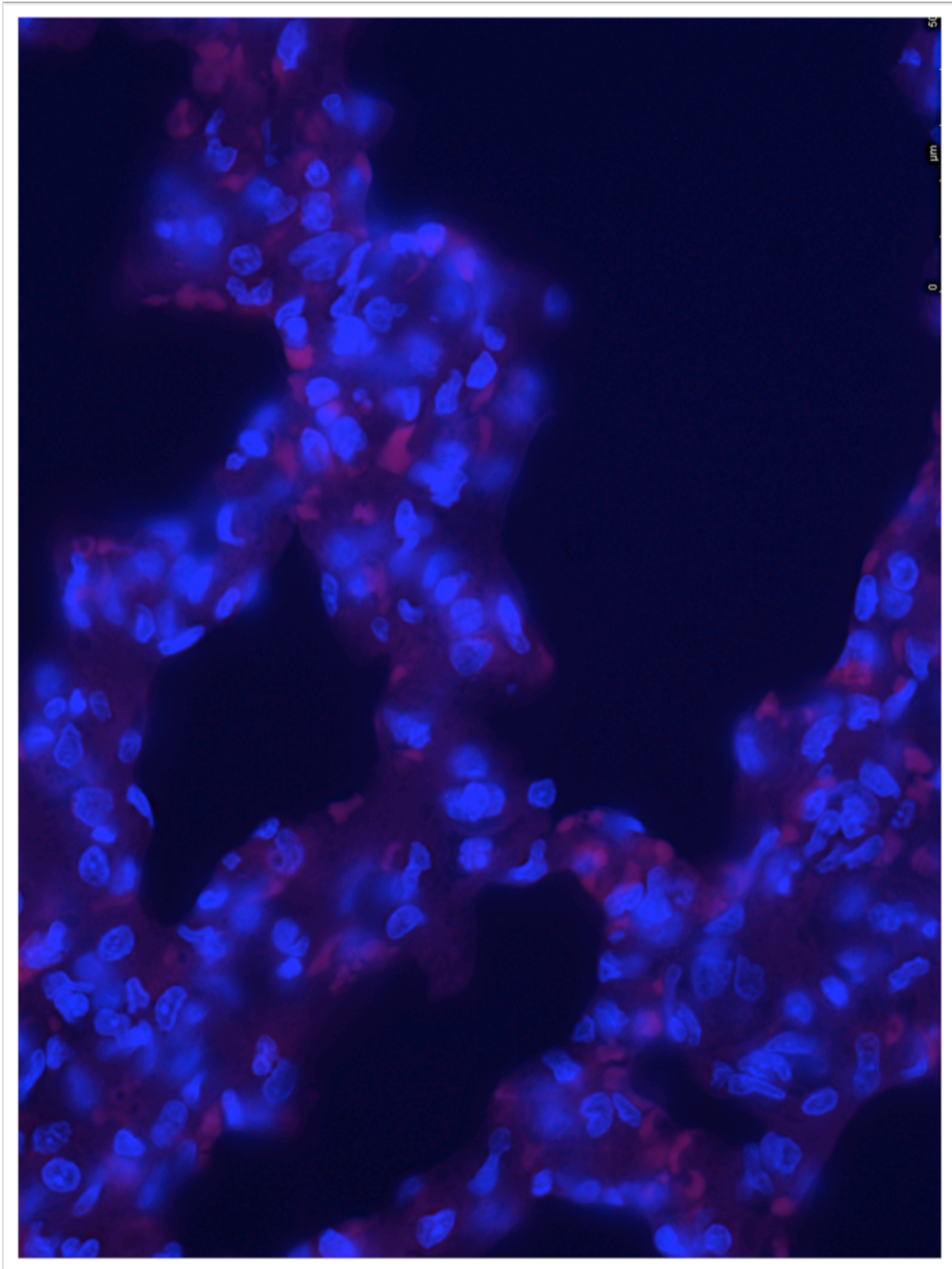


Figura 37. Pulmón a 48h, grupo ASCs; tinción con PKH26.

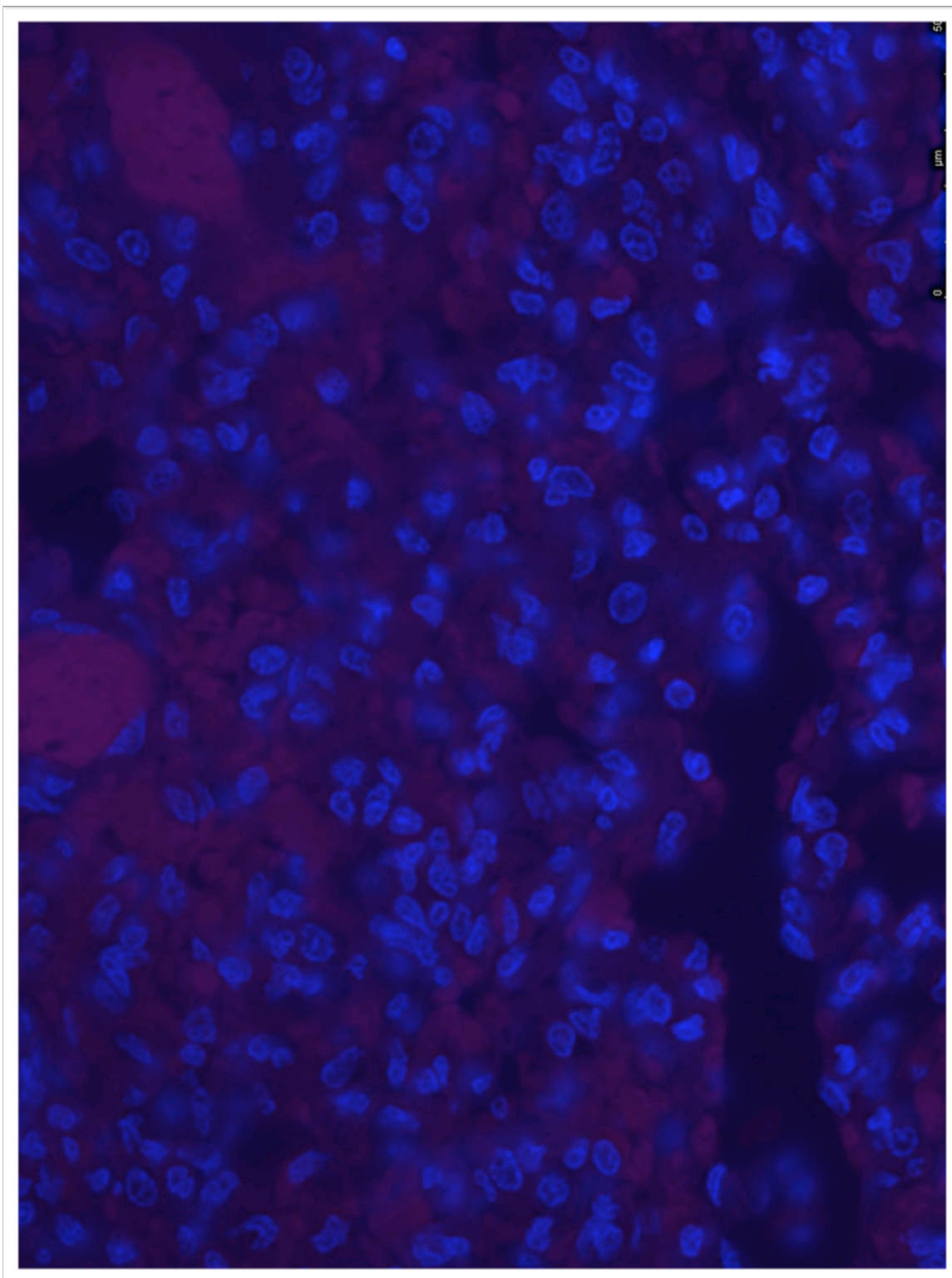


Figura 38. Pulmón a 48h, grupo CCl₄ + ASCs; tinción con PKH26.

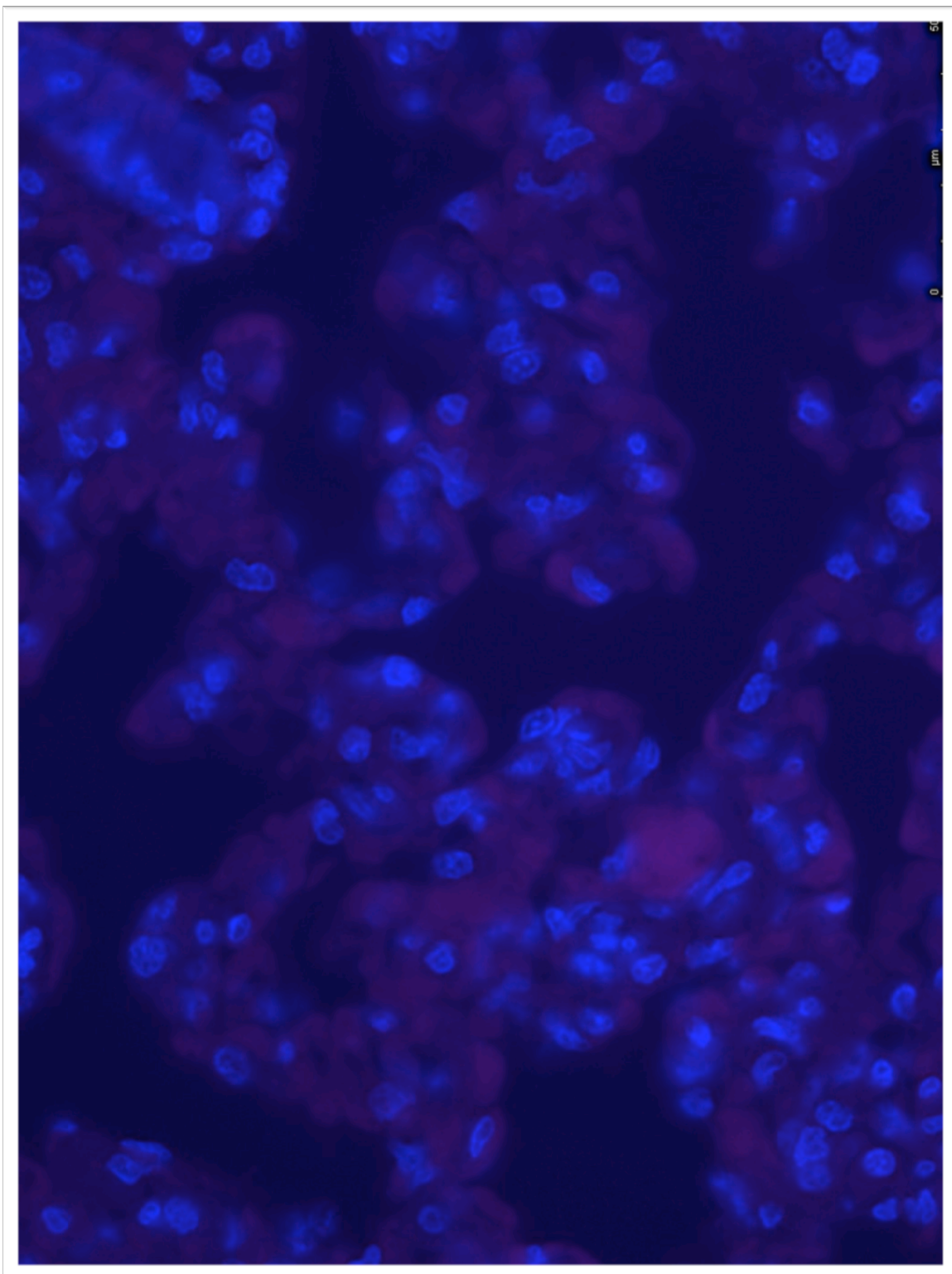


Figura 39. Pulmón a 7 días, grupo ASCs; tinción con PKH26.

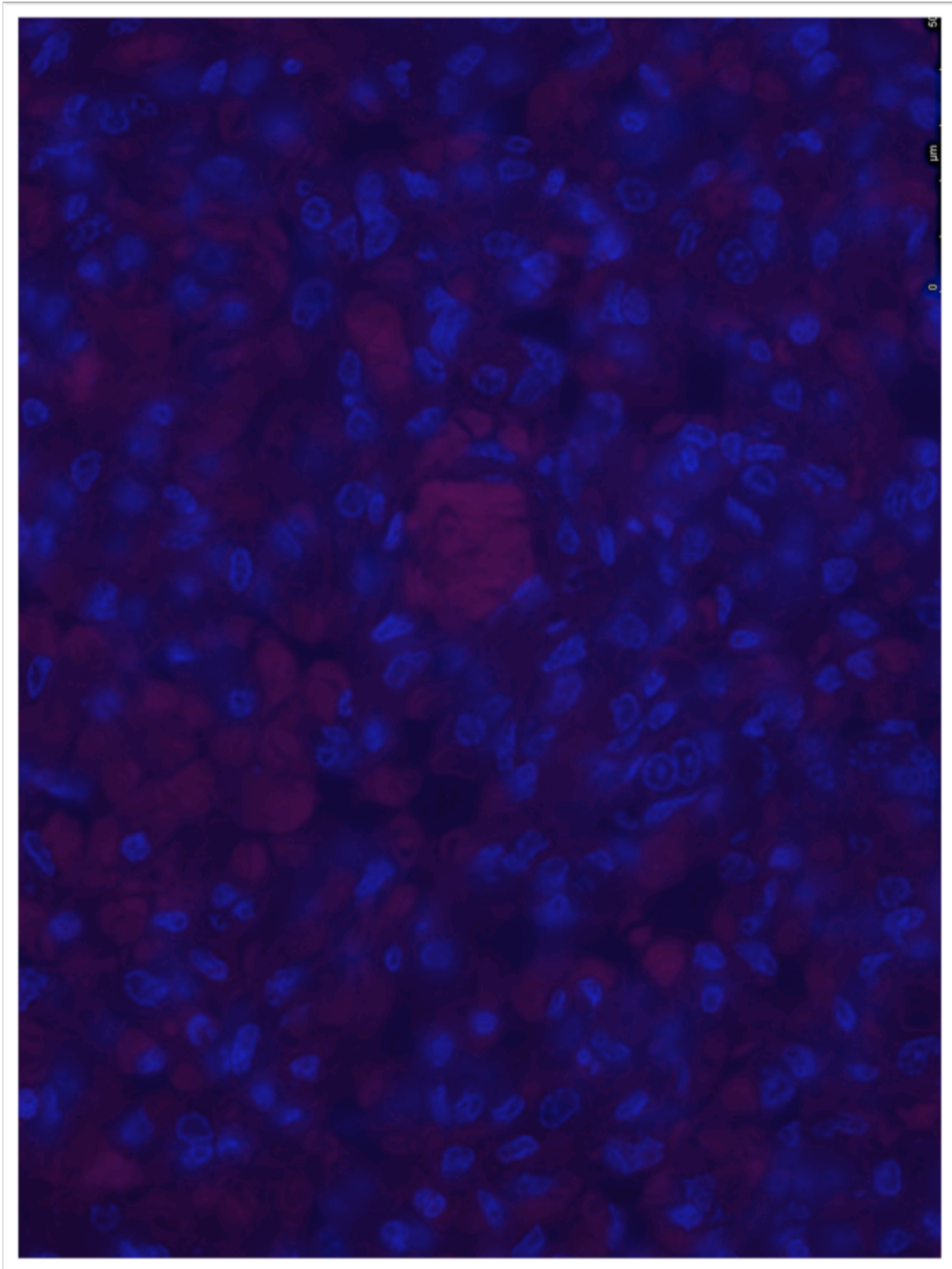


Figura 40. Pulmón a 7 días, grupo CCl₄ + ASCs; tinción con PKH26.

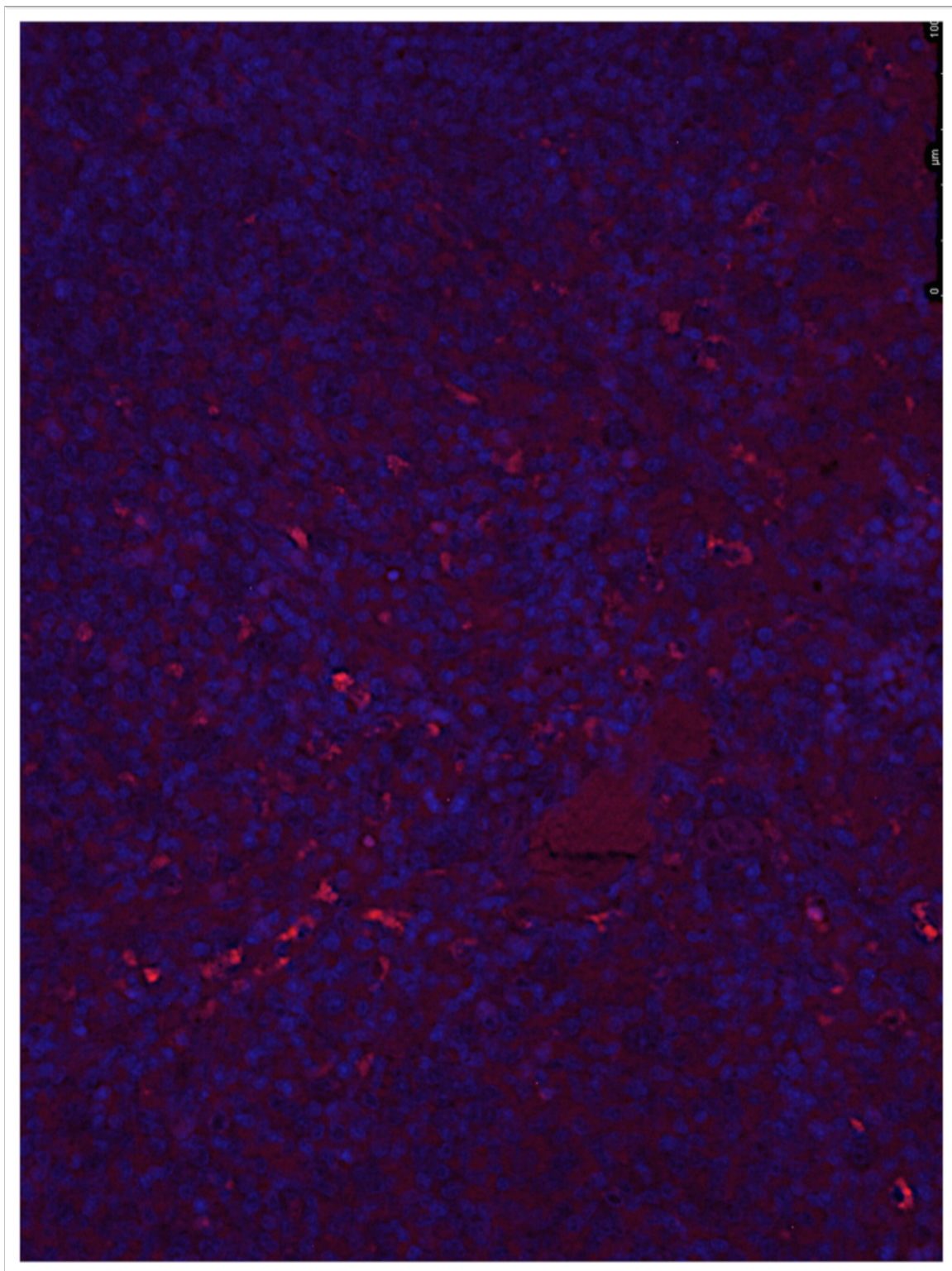


Figura 41. Bazo a 24h, grupo ASCs; tinción con PKH26.

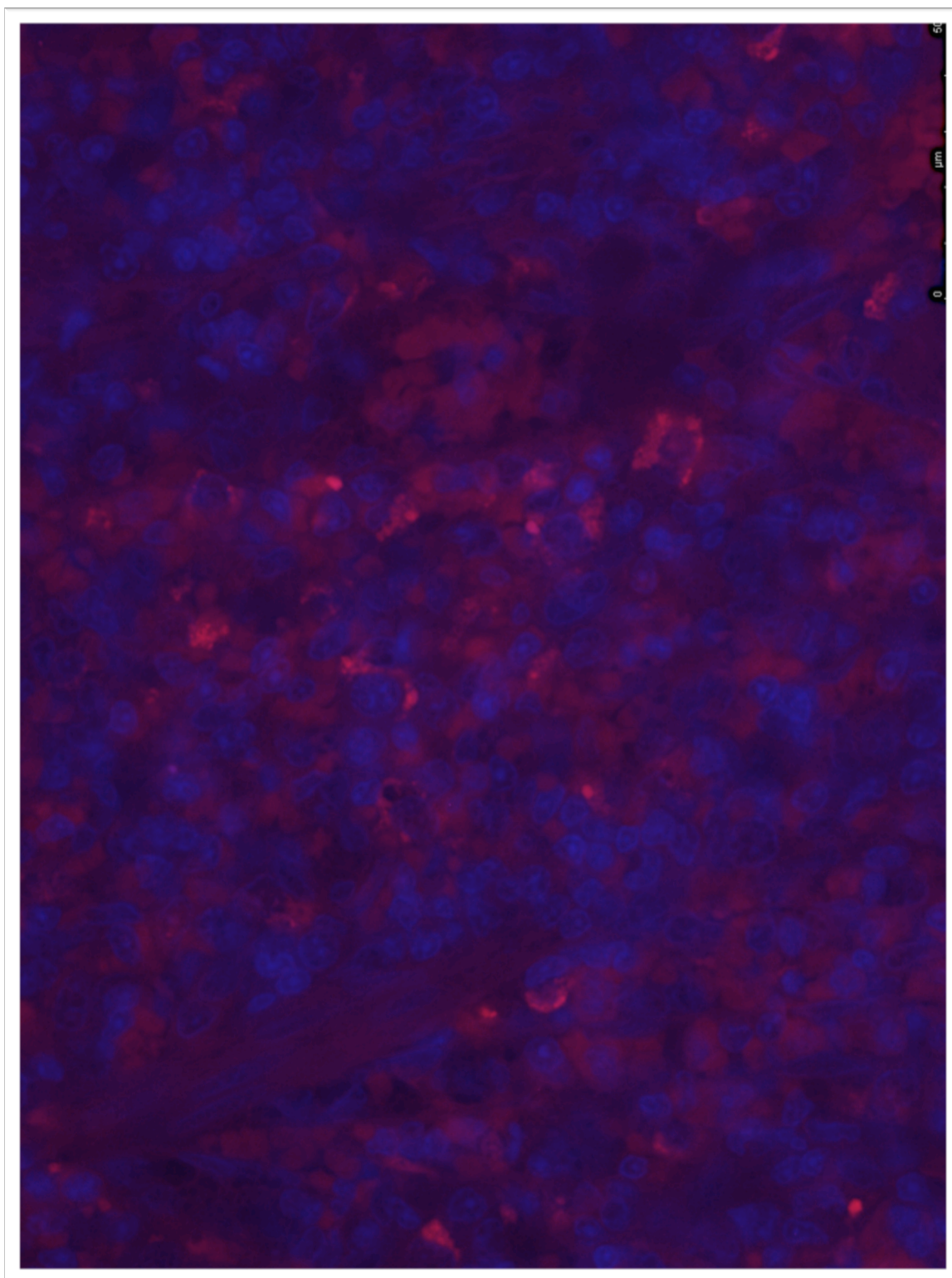


Figura 42. Bazo a 24h, grupo CCl_4 + ASCs; tinción con PKH26.

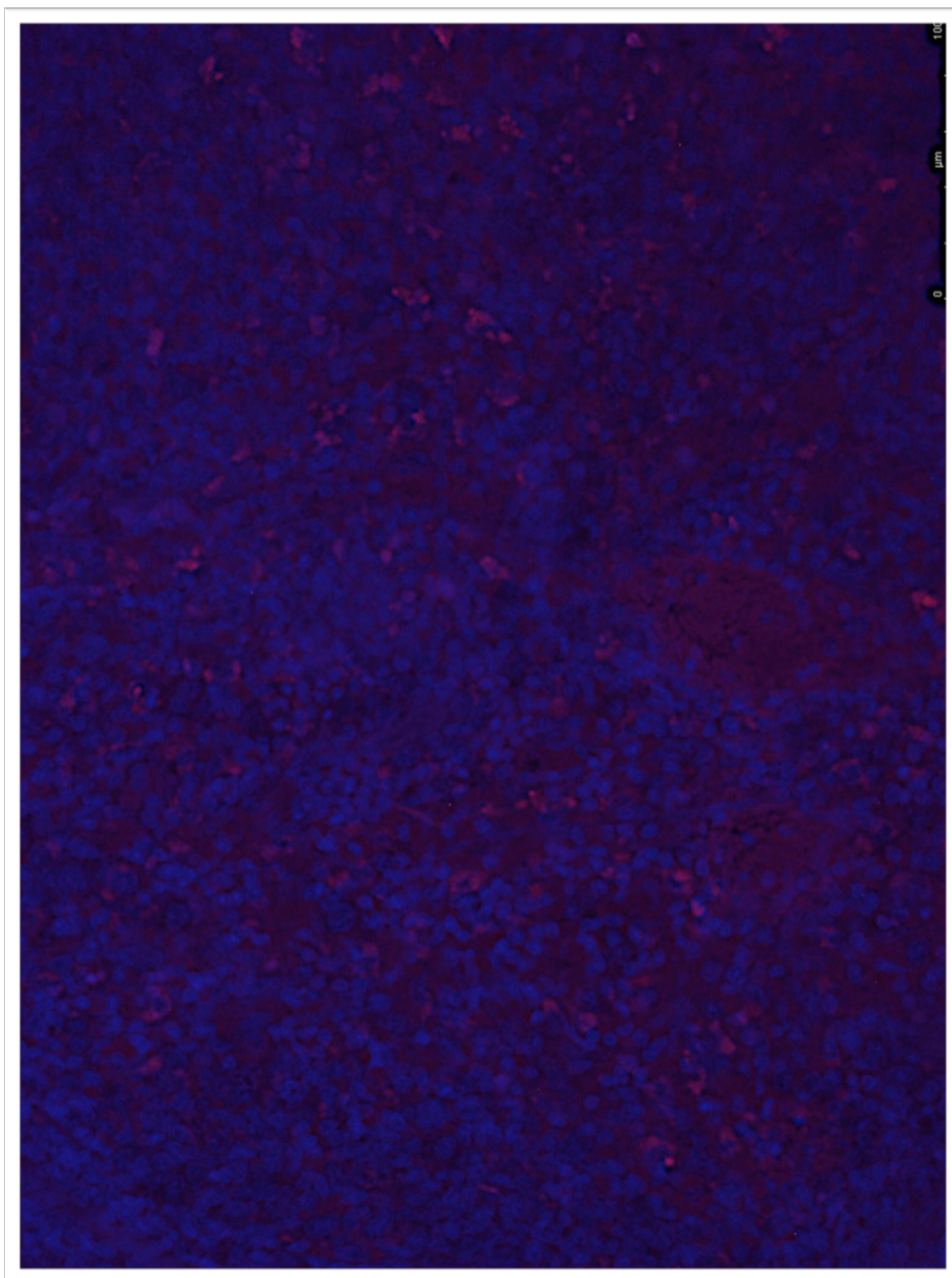


Figura 43. Bazo a 48h, grupo ASCs; tinción con PKH26.

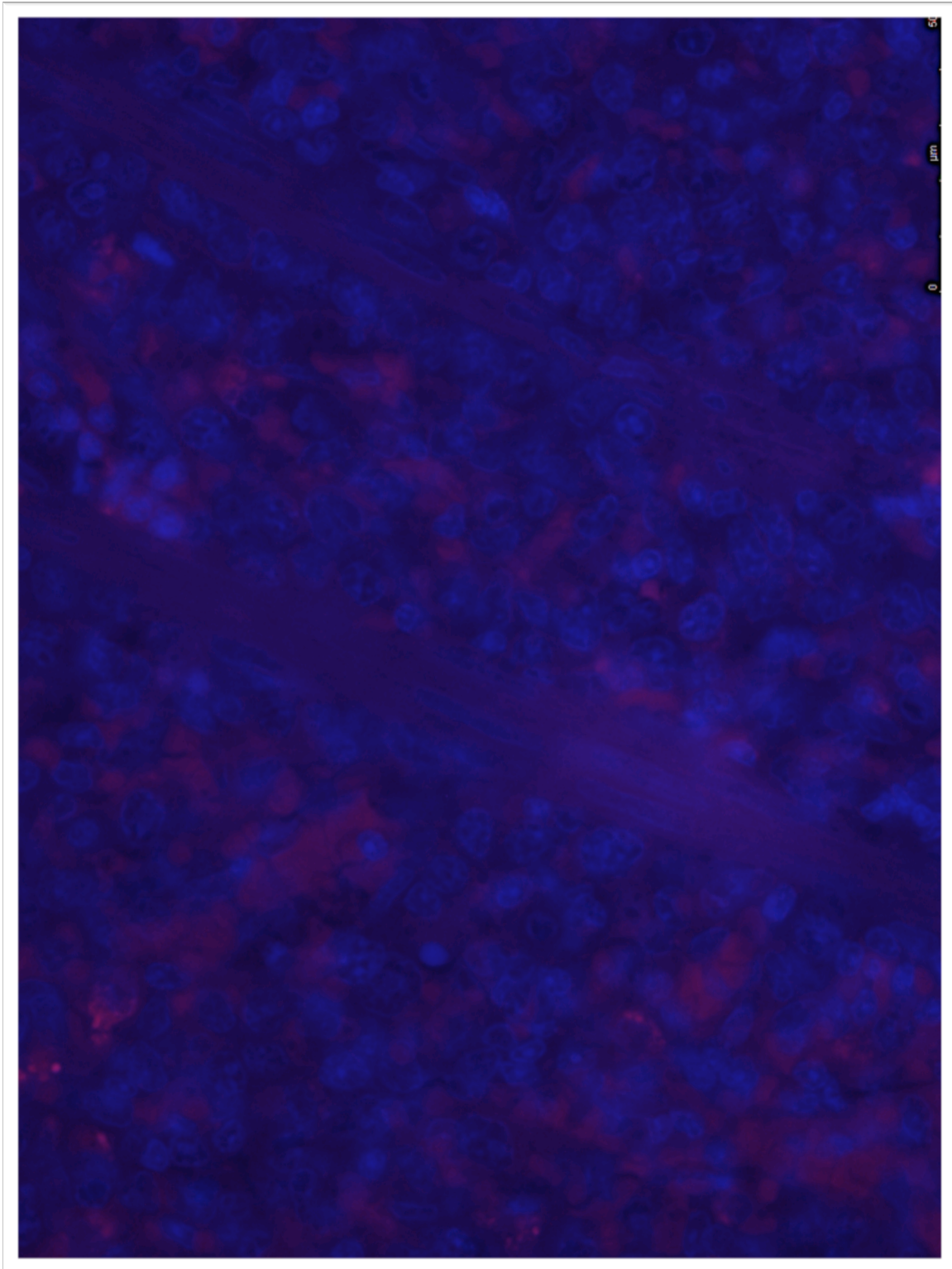


Figura 44. Bazo a 48h, grupo CCl₄ + ASCs; tinción con PKH26.

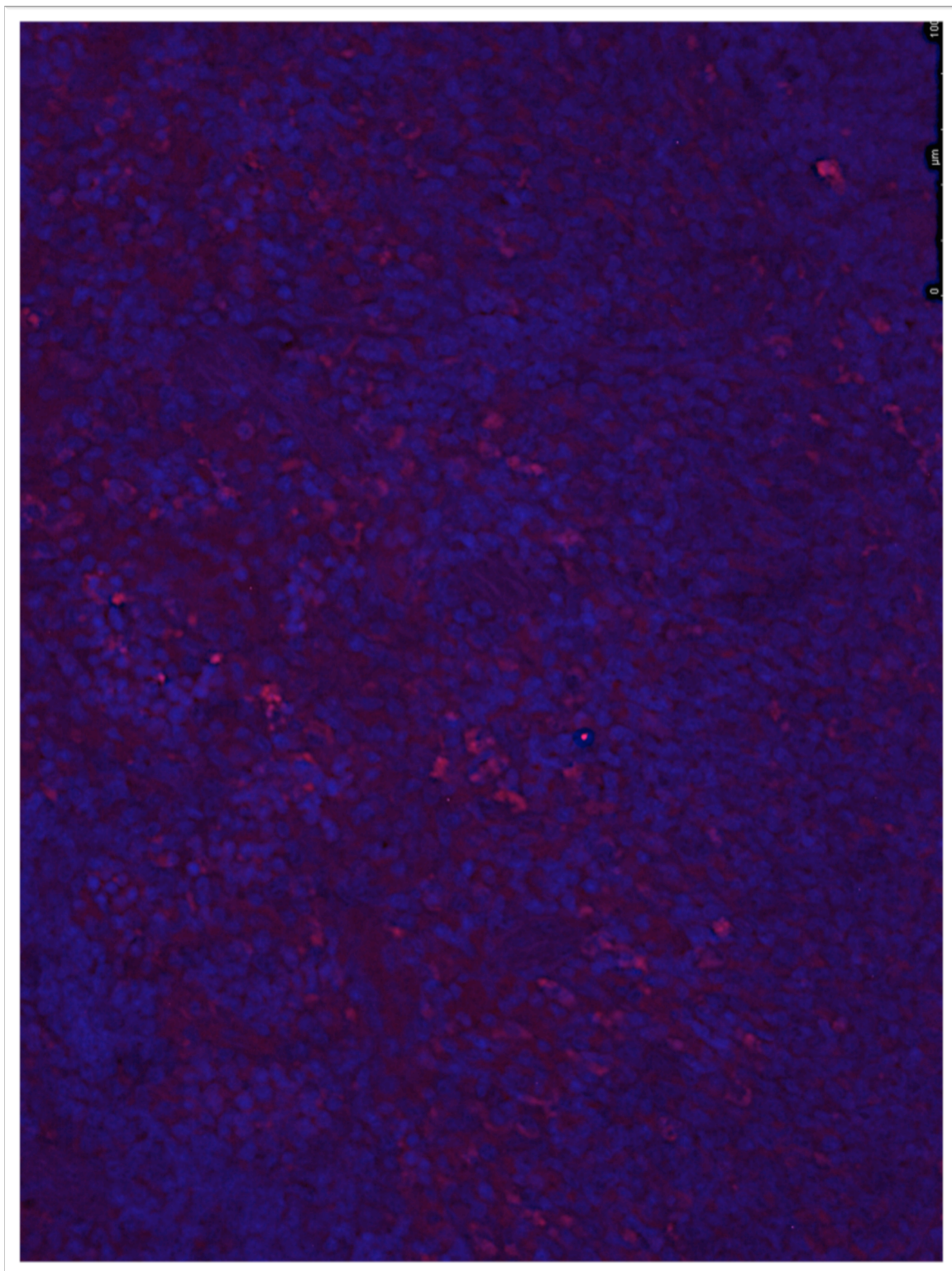


Figura 45. Bazo a 7 días, grupo ASCs; tinción con PKH26.

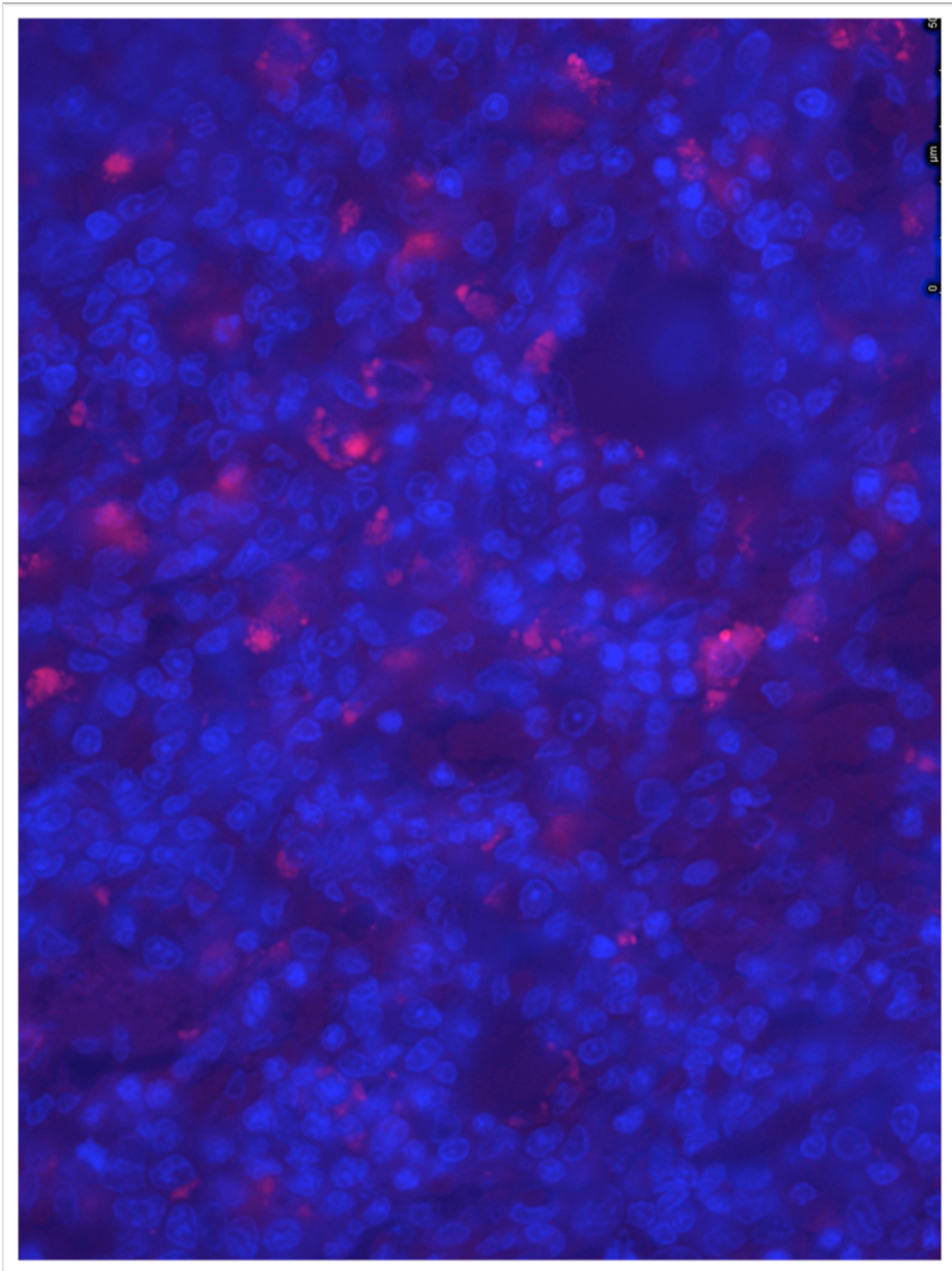


Figura 46. Bazo a 7 días, grupo CCl₄ + ASCs; tinción con PKH26.

6. DISCUSIÓN

6.1. RELEVANCIA CLÍNICA DEL ESTUDIO

La insuficiencia hepática aguda es un cuadro clínico complejo, resultado de una incapacidad transitoria o permanente de los hepatocitos para realizar las funciones de síntesis, metabolización y detoxificación propias del hígado, y que se produce como consecuencia de una agresión celular directa.

Son diversas las etiologías que pueden desencadenar un cuadro de IHA, siendo las hepatitis víricas la causa más frecuente en España, seguida de la idiopática o indeterminada, pero con una incidencia global baja. Esto se debe a una mejor educación sanitaria de la población y adherencia a las medidas de prevención primaria, así como a un mejor control de la carga viral gracias a los avances de la industria farmacéutica y a un mayor control sobre los productos hemoderivados con fines transfusionales, que minimizan enormemente el riesgo de transmisión horizontal y vertical.

Hoy en día, la seguridad de la cirugía hepática, merced a la posibilidad de realizar estudios funcionales, volumétricos y de acondicionamiento prequirúrgico (hipertrofia compensadora mediante embolización portal, aclaramiento del verde de indocianina), permite realizar resecciones amplias minimizando el riesgo de desarrollar IHA en el postoperatorio inmediato.

El grupo etario más comúnmente afectado es característicamente el de jóvenes por debajo de los 40 años, con el consecuente impacto en años de vida potencialmente perdidos, pero su relevancia clínica radica en la ausencia de un tratamiento eficaz — con aumento de la supervivencia a largo plazo —, distinto del trasplante hepático², a pesar de los avances en las terapias de soporte intensivo y del desarrollo de dispositivos artificiales y bioartificiales de asistencia hepática.

La supervivencia en la IHA depende de muchos factores, entre los cuales destaca la propia etiología, la existencia de un tratamiento específico según la causa, el desarrollo de encefalopatía, etc., pero globalmente, sólo el 35% de los pacientes con IHA sobreviven con medidas de soporte sin trasplante hepático. Por el contrario, la supervivencia global postrasplante por IHA a uno y cinco años en nuestro país es del 75,3% y del 70,5%, respectivamente¹⁴⁴.

El problema fundamental estriba en la selección de candidatos a trasplante, ya que nos encontramos ante una entidad en algunos casos potencialmente reversible y a una solución no disponible siempre y gravada con un alto índice de complicaciones a largo plazo. Ya hemos comentado la falta de precisión de los sistemas de puntuación, como el KCC o el MELD, para la estratificación del riesgo y necesidad de TH y el importante número de pacientes que, estando en lista de espera para trasplante, tienen una recuperación espontánea.

En este contexto, en el que es evidente la necesidad de nuevos abordajes para el tratamiento de la IHA, la terapia celular surge como una posible alternativa en el armamentario terapéutico; la posibilidad de inocular en un paciente células con capacidad de integrarse en el tejido del órgano dañado y asumir sus funciones biológicas y/o estimular su regeneración es una estrategia muy atractiva por diversas razones.

Además de intentar eludir el TH, que es limitado y costoso en cuanto a consumo de recursos y con una morbilidad nada despreciable — mortalidad del 35% en el primer año en algunas series históricas³⁷⁴ —, ofrece la posibilidad de inyectar células inmunocompatibles y así, evitar también la necesidad de medicación inmunosupresora de por vida, eliminando sus efectos adversos — las infecciones son una de las principales causas de mortalidad postrasplante —; existen multitud de fuentes que pueden ser expandidas cuasi indefinidamente, no existiendo la escasez de donantes como factor limitante y es una terapia que ha demostrado ser siempre segura en aquellas patologías en las que se ha utilizado y, tener un impacto clínico relevante frente a las alternativas terapéuticas clásicas en muchos casos.

La terapia celular, como hemos comentado en la introducción, es un tema de actualidad, aunque son varias ya las décadas que se lleva investigando la aplicabilidad de dicha terapia en diferentes campos de la medicina y constituye un ejemplo perfecto de investigación traslacional, es decir, de transferencia del conocimiento fruto de la investigación básica a la práctica clínica habitual.

Hasta la fecha de hoy, los estudios que se han llevado a cabo en relación a la terapia celular y la insuficiencia hepática a nivel clínico son con células parenquimatosas

maduras, es decir, con hepatocitos adultos o con células madre en el fallo hepático agudo sobre crónico, que aunque comparte rasgos clínicos con la IHA, se trata de una entidad nosológica bien definida y diferente. Por tanto, el uso concreto de células madre para el tratamiento de la IHA sigue siendo un campo por explorar, ya que aunque existe mucha y sólida evidencia experimental, aún no se ha iniciado la investigación en el ámbito clínico.

Nuestro grupo de investigación se propone estudiar el uso potencial de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en el tratamiento de la IHA. El objetivo final es validar su aplicabilidad clínica, pero para ello, y a pesar de la literatura existente, consideramos necesario hacer primero una prueba de concepto con las células con las que habitualmente trabajamos.

6.2. IDONEIDAD DEL MODELO EXPERIMENTAL

Los modelos preclínicos publicados, concretamente los modelos animales, son extensos tanto en especies, como en tipo de células y forma de inducción de la IHA utilizados. Los modelos más habituales, por ser menos complejos, son los de IHA inducida por fármacos o sustancias hepatotóxicas y los animales más frecuentemente utilizados, ratones y ratas, por su mayor disponibilidad y menor coste individual, de mantenimiento y de material de investigación — anticuerpos para inmunohistoquímica, colorantes para tinciones, etc. —.

El tetracloruro de carbono es una de las sustancias más ampliamente utilizadas en investigación para desarrollar modelos de IHA. Algunas de sus ventajas son su bajo coste y su fácil y segura manipulación, frente a otras sustancias que tienen un mayor riesgo biológico. Algunos autores, sin embargo, no la consideran la más apropiada al no ser 100% selectiva en su toxicidad y poder afectar a otros órganos, como riñones y pulmones, y ser muy variable la relación entre la dosis y el daño hepático provocado.

En contra de esta opinión y el criterio de nuestro grupo es que, de hecho, el desarrollo de IRA por toxicidad directa, en vez de por afectación secundaria — hipoperfusión por alteraciones hemodinámicas derivadas del fallo hepático —,

plantea por un lado, un escenario real como es la IHA por paracetamol — causa más frecuente de IHA en países occidentales desarrollados y cuya lesión histológica remeda el tetracloruro de carbono — en el que existe nefrotoxicidad tanto directa como indirecta y, por otro lado, un pronóstico a priori más desfavorable, por lo que cualquier intervención, en nuestro caso la administración de ASCs, tendrá mayor relevancia. Además, la IRA funcional provocada por las alteraciones hemodinámicas, en última instancia, acaba convirtiéndose en una necrosis tubular aguda por isquemia, indistinguible de la lesión directa, y su incidencia es cercana al 80% de los casos en seres humanos.

Por otra parte, las autopsias realizadas no objetivaron ningún daño orgánico distinto del hepático y el estudio histológico, como se comentó en el apartado de resultados, demostró un grado de necrosis III-IV en el 100% de los especímenes tratados con la dosis de 5 mL/Kg al 25%.

Una cuestión siempre discutida de estos modelos es la capacidad de predecir de forma precoz y precisa el desarrollo de daño hepático, históricamente de gran interés en la industria farmacéutica para el desarrollo de nuevos medicamentos³⁷⁵. Clásicamente se han utilizado los niveles séricos de transaminasas citosólicas (AST y ALT) para determinar la existencia de una ruptura o pérdida de integridad de la membrana celular de los hepatocitos y por tanto, como indicador de necrosis.

La IHA se define por la presencia de encefalopatía y coagulopatía y los enzimas hepáticos no tienen un papel relevante desde el punto de vista diagnóstico en seres humanos. Además, es un hecho conocido que no existe una correlación entre estos niveles y la reversibilidad o irreversibilidad del daño hepático. Sin embargo, la seriación de los niveles de AST y ALT, así como de GGT, FA y B_T es rutinaria en la práctica clínica habitual y en todos los estudios de investigación se realiza siempre de forma complementaria y no sustitutiva del análisis histopatológico.

El trabajo de Wahi et al. (1955)³⁷⁶ demuestra la existencia de alteraciones bioquímicas, concretamente, una disminución de la actividad de la fosfatasa alcalina en la zona de la vena centrolobulillar, a las dos horas de la administración del CCl₄ sin que en la tinción con HE hubiera lesiones histológicas reconocibles. En un sentido opuesto, el trabajo de Grice et al. (1971)³⁷⁷ demuestra la existencia de

6. DISCUSIÓN

daños en las organelas celulares de los hepatocitos a dosis de CCl₄ muy bajas (0,03 mg/Kg al 3%), observados mediante microscopía electrónica, antes de que se detectaran alteraciones del perfil bioquímico — AST y LDH — a las 24h tras la inyección intraperitoneal del tóxico. En este mismo estudio, a dosis crecientes de CCl₄ se observaron mayores alteraciones bioquímicas.

En nuestro estudio de dosis, la lesión hepática esperada según los criterios bioquímicos de Bénichou³⁷³, se objetivó en un 0% en el grupo de control, un 20% en D₁, un 60% en D₂, un 40% en D₃, un 20% en D₄ y un 50% en D₅ y D₅'.

El aumento de los niveles séricos de ALT, considerada un biomarcador de hepatotoxicidad más sensible y específico que la AST³²⁹, se asoció siempre a una elevación de esta última, como era de esperar, sin embargo, después del análisis estadístico, los niveles de AST y ALT fueron independientes de la dosis administrada y solo se observó un patrón temporal con diferencias significativas en el grupo D₅.

Los niveles de ALT a las 48h fueron significativamente mayores que a los 7 días ($p = 0.046$), mientras que los niveles de AST fueron superiores a las 24h y 48h con respecto a los 7 días ($p = 0,040$ y $p = 0,047$, respectivamente).

Los niveles plasmáticos de la FA, que se elevan en las enfermedades hepáticas colestásicas, fueron significativamente mayores en el grupo D₅, mientras que la bilirrubina total permaneció sin alteraciones. Estos hallazgos son consistentes con otros estudios en los que una elevación de la FA se considera como secundaria a la regeneración hepática e irritación de las células del epitelio biliar canalicular, que son ricas en FA^{376,378}.

Independientemente de los hallazgos bioquímicos, la gravedad del daño hepático fue dosis-dependiente, con progresión desde infiltrados inflamatorios de polimorfonucleares hasta una necrosis coagulativa centrolobulillar (zona 3) con vacuolización lipídica y sin daño endotelial, con una mayor variabilidad individual en los grupos D₃ y D₄.

En nuestro trabajo, 14 de las 23 ratas estudiadas a 24h, a las que se les administró CCl₄ como control frente al grupo de IHA y tratamiento con ASCs, presentaron

necrosis definida por criterios bioquímicos, concretamente, por elevación en más de dos veces el límite superior normal de la ALT en todos los casos, lo que representa el 60,87%. Hay que recordar que los criterios de Bénichou se aplican para IHA en humanos exclusivamente, pero decidimos trasladarlos a nuestro modelo ya que no existe ningún criterio consensuado en ratas y porque pensamos que serían unos criterios restrictivos y, por tanto, más exigentes a la hora de establecer el diagnóstico de fallo hepático. De hecho, ya que el 100% de los individuos tratados con CCl₄ a 5 mL/Kg al 25% tuvieron necrosis hepática grado III-IV en el estudio histológico, todas las ratas con alteración del perfil bioquímico tuvieron necrosis hepática y, por tanto, la especificidad de estos criterios es del 100%. Sería sin embargo posible con estos resultados, aunque no era el objeto de nuestro trabajo, poder ajustar los criterios de Bénichou para aumentar su sensibilidad.

De esta forma, podríamos evitar la necesidad de una pre-biopsia³⁷⁹ — una biopsia previa a la inducción de la hepatotoxicidad — que algunos autores preconizan por la variabilidad interindividual en el DILI (*Drug-induced liver injury*) de las ratas Sprague-Dawley mencionada anteriormente — hasta el 30% —. Esta variabilidad se explica, además de por factores como la edad o el sexo, por la existencia de polimorfismos genéticos relacionados con el metabolismo lipídico y la inmunidad, que confieren una mayor o menor susceptibilidad innata a la toxicidad por CCl₄³⁷⁹. El estudio de estos genes mediante biopsia, podría garantizar la selección de especímenes con la susceptibilidad deseada y predecir la respuesta al tóxico antes de su administración, por tanto, evitando el uso excesivo de animales.

Sin embargo, la realización de una biopsia y el estudio genético en cualquier estudio de IHA supone añadir una técnica con complicaciones, incluso la pérdida del animal por muerte — hemorragia, infección, etc. —, y una mayor inversión en coste y tiempo.

Así pues, sean las alteraciones bioquímicas las primeras o no en aparecer tras la inducción del fallo hepático y tengan dichas alteraciones bioquímicas una insuficiente correlación con el grado de lesión histológico, el hecho es que su presencia sí demuestra la existencia de afectación orgánica. Por ello, la

cuantificación de estas enzimas sigue siendo importante y decidimos obtener muestras en nuestro estudio para su análisis.

Otros enzimas, especialmente aquéllos relacionados con el estrés oxidativo tienen una mejor correlación con el daño hepático inducido por el CCl₄. La glutamato deshidrogenasa (GDH), un enzima mitocondrial, tiene una mayor sensibilidad para predecir necrosis hepática^{366,367}, pero su medición, aunque posible, no se realiza de forma rutinaria por la falta de estandarización en el uso de reactivos³⁸⁰.

Desde el punto de vista analítico, aparte de la bioquímica hepática, el estado de la coagulación es fundamental y sus variaciones constituyen un importante factor pronóstico, por lo que está incluida en la mayoría de los índices y scores de morbimortalidad y forma parte de la definición actual de IHA.

Pritchard et al.³³⁹ observaron en ratas Sprague-Dawley macho un aumento del TTPa a las 6h y del TP a las 16h tras la administración de CCl₄, por tanto, demostrando una similitud importante con el cuadro clínico producido en seres humanos. Además, ninguno de los estudios de IHA realizados en animales describe la aparición de eventos hemorrágicos, pudiendo ser un dato a favor de la existencia, al igual que en los seres humanos, de una coagulación balanceada a expensas de la disminución o del aumento de los niveles de otros componentes de la misma.

Sin embargo, como comentamos en la introducción, la literatura más reciente sostiene que, en realidad, los fenómenos trombóticos pueden ser más frecuentes que los hemorrágicos en pacientes con IHA y es necesario introducir de forma precoz la profilaxis antitrombótica. En nuestro estudio, la obtención de muestras adecuadas para el análisis bioquímico de la rata que falleció a las 48h tras la inyección de CCl₄ fue imposible, ya que éstas se coagulaban nada más extraerse. Aunque no tenemos datos que lo confirmen, ya que la batería de análisis necesaria sería muy extensa, probablemente se trataba de una diátesis protrombótica provocada por el fallo hepático.

Dado el excesivo volumen necesario extraer a cada animal para el análisis de coagulación, debido al autoanizador del que disponemos, no fue posible realizar las determinaciones de estos parámetros.

Es posible que alguno de los individuos con bioquímica normal, pero necrosis hepática confirmada, tuviera alteraciones de los parámetros de la coagulación. No obstante, son las variaciones del INR el factor que tiene valor pronóstico en humanos y, por tanto, el factor a haber estudiado con respecto a la coagulación, sin embargo, debido al diseño de nuestro estudio, la determinación aislada de una o dos muestras por animal no hubiera aportado al trabajo más que poder establecer el diagnóstico de IHA previo a la necropsia, de forma similar al realizado mediante el estudio de las transaminasas.

En cuanto a la mortalidad por fallo hepático como criterio necesario para la creación de un modelo de IHA, según Terblanche y Hickman³²¹, la mortalidad alcanzada en el estudio de dosis fue del 20%, que era el objetivo que nos habíamos marcado previamente para considerar válida la dosis, aunque hay que tener en cuenta que, cuando se aplica un análisis de supervivencia, la variable de interés es “tiempo hasta el exitus”, y al tener pocos casos y muy precoces tenemos pocos “tiempos hasta el exitus” observados y, por tanto, estos resultados debían ser valorados con cautela y ser confirmados posteriormente.

En el grupo D₆ — n = 15 —, que se utiliza para confirmar el grado de lesión histológica, observamos una mortalidad del 26, 67%, y al observar la mortalidad global de las ratas utilizadas como control de IHA frente las tratadas con ASCs — n = 30 —, obtenemos un 23,33% (tabla 28).

La regeneración hepática es un fenómeno conocido desde hace mucho tiempo, pero cuyos mecanismos, sin embargo, no son del todo bien comprendidos, incluso a día de hoy.

El hígado, de forma fisiológica y al igual que muchos otros tejidos, recambia su población celular, sustituyendo los hepatocitos más viejos, que tienen una vida media de 200 – 300 días, por otros más jóvenes. Esta repoblación se produce a expensas de la replicación de hepatocitos adultos y de células epiteliales de

conductos biliares (colangiocitos) existentes, siendo mínima la contribución de las células progenitoras.

Sabemos que, tras una resección hepática parcial — una agresión hepática —, existe una hiperplasia compensadora de los lóbulos remanentes, secundaria a una proliferación celular, pero esta vez, en cuestión de apenas horas o pocos días. Esta proliferación se produce a expensas igualmente de la replicación de hepatocitos y colangiocitos adultos ya existentes, que es la forma más rápida y eficaz de regeneración y reparación hepáticas.

Que células diferenciadas sean la primera línea de respuesta ante una agresión, y que las células madre o progenitoras del tejido sean una reserva, es un fenómeno característico del hígado. En la mayoría de los órganos y tejidos, las células diferenciadas apenas tienen capacidad de replicación y la regeneración, cuando existe, se debe fundamentalmente a la proliferación de poblaciones celulares pluripotenciales, como por ejemplo, las células satélite progenitoras en el caso del músculo estriado esquelético.

Otras formas reconocidas de regeneración hepática son la diferenciación de células ovales, que se activan cuando existe un retraso o bloqueo de la replicación del hepatocito maduro, o la producción de células hepáticas a partir de la médula ósea, como se demuestra en hígados trasplantados, pero cuya importancia radica, sin embargo, en la producción de células no parenquimatosas, como las células de Kupffer o las células endoteliales, ya que la cantidad de células hepáticas producida es insuficiente si se trata de suplir una pérdida funcional aguda y grave.

En el caso del hígado, la población de células con capacidad pluripotencial, son las mencionadas células ovales. Las células ovales tienen dificultad para autoregenerarse, por lo que no son consideradas verdaderas células madre, sino células progenitoras hepáticas (HPC) o células amplificadoras transitorias, bipotenciales, capaces de diferenciarse tanto en hepatocitos como en colangiocitos.

Ante determinados estímulos — especialmente mediados por la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) —, las células madre hepáticas adultas (HASC), verdaderas células madre que residen en los canales de Hering o sistema ductular

biliar terminal y habitualmente quiescentes, se activan originando las células ovales, que posteriormente y tras la fase de proliferación o amplificación, migran y se diferencian. La activación de las HASC/HPC depende, como hemos comentado, de la incapacidad de los hepatocitos maduros de proliferar. Esto sucede ante diversas enfermedades hepáticas crónicas, no así, de manera al menos significativa, en la IHA.

Por tanto, en la IHA aguda nos encontramos con unas células maduras no funcionantes y una población residente de células pluripotentes incapaz de sustituir a las células dañadas.

Ante esta situación se abren varias posibles líneas de actuación desde el punto de vista de la terapia celular. Por un lado, se podrían utilizar diversos tipos celulares para diferenciarlos en hepatocitos adultos maduros y así, garantizar las funciones hepáticas mientras se produce la regeneración del parénquima lesionado y por otro lado, se podrían utilizar las células madre, gracias a la función de modulación de la respuesta inflamatoria de algunas de ellas, como un agente protector frente a la necrosis y apoptosis inducida por el daño hepático, disminuyendo así la pérdida de parénquima funcionante.

Ambas posibilidades podrían combinarse, si fuera necesario, con el uso de dispositivos de soporte hepático, mejorando las opciones de supervivencia y evitando llegar a la necesidad del trasplante hepático.

En este sentido, tal y como hemos comentado en la introducción, si abordamos la cuestión desde la perspectiva de sustituir o repoblar el hígado dañado con células funcionantes, disponemos por un lado de células maduras con plena capacidad funcional (hepatocitos adultos), pero que son difíciles de cultivar y cuyo mantenimiento en condiciones de criopreservación sin pérdidas al revertir el proceso también es difícil y por otro lado, disponemos de una pléyade de células inmaduras (hepatocitos fetales y células madre de diverso origen) que tienen una gran facilidad de proliferación en medios de cultivo, pero una capacidad de diferenciación plena y de soporte metabólico limitadas.

El primer grupo ha sido ampliamente utilizado en la clínica, mientras que el segundo está aún a nivel preclínico y pese a que adolece de las funciones de síntesis y detoxificación de una célula hepática adulta diferenciada, la información aportada por los estudios experimentales, que es extensa, indica que su capacidad metabólica, a pesar de ser limitada, puede ser suficiente y que, por tanto, pueden tener un papel beneficioso en el tratamiento de la IHA gracias, en algunos casos, como lo es en el de las MSCs/ASCs, a los efectos inmunomoduladores, antimicrobianos y antioxidantes que poseen y previamente descritos.

Dada lo anteriormente expuesto, la experiencia que tiene nuestro grupo en el cultivo de ASCs, los efectos positivos de estas células en diversas patologías y gracias a su fuente de gran disponibilidad y fácil accesibilidad, el tejido adiposo, decidimos investigar el efecto de las ASCs en la IHA. Una ventaja de nuestro estudio fue el uso de células alogénicas, por tanto, valorando también el efecto de estas células cuando provienen de otro individuo genéticamente diferente a aquel al que se le aplican, con los problemas de inmunogenicidad que esto podría suponer.

Una vez decidido el tipo de célula que vamos a utilizar, una cuestión fundamental es decidir la ruta de administración de dichas células. La literatura previa es muy variada y se describe la inyección vía arterial, la inyección portal, la intraesplénica, la intraparenquimatosa, intraperitoneal, enteral, traqueal, la vía venosa central y la periférica entre otras³⁸¹.

Decidimos realizar la inyección de las ASCs utilizando un acceso venoso periférico. La razón es, siguiendo el mismo principio que para el uso de células alogénicas en vez de autólogas, tratar de crear un modelo que, en caso de poder ser trasladado a la práctica clínica, sea lo más sencillo posible y con el menor número de limitaciones.

Los órganos que interesa analizar para el estudio de la ruta celular — distribución de las ASCs — son el bazo, por su capacidad de “secuestrar” diferentes tipos de células (linfocitos, etc.) o partículas subcelulares (plaquetas, etc.) como parte de su función inmunológica normal o como respuesta a determinados estímulos provocados por situaciones patológicas, y el pulmón, ya que su fina red capilar

6. DISCUSIÓN

constituye un filtro natural para gran cantidad de partículas que superen un determinado tamaño.

Por tanto, a través de la vena lateral de la cola, las ASCs deben alcanzar la circulación sistémica atravesando el lecho capilar pulmonar y, una vez superado éste, distribuirse según el flujo esplácnico a todos los demás órganos.

En nuestro trabajo, a las 24h de la inyección del CCl_4 , el recuento de ASCs en el pulmón fue significativamente mayor con respecto al grupo control ($P = 0,013$), siendo las diferencias a 48h y 7 días no significativas, mientras que en el bazo, el recuento fue mayor en el grupo control a las 48h con respecto al grupo de IHA ($P = 0,023$).

Así pues, las ASCs en el grupo control que pasan el filtro pulmonar parece que se quedan secuestradas en el bazo y son eliminadas, mientras que en el grupo de IHA, la posible toxicidad pulmonar del CCl_4 hace que permanezcan más células retenidas, pero sin embargo, aquellas que logran pasar no son secuestradas por el bazo y son reclutadas a nivel hepático.

Como comentamos respecto a los estudios histológicos, la única lesión que se encontró fue en el hígado y, a nivel pulmonar por tanto, no se detectaron alteraciones con la tinción de HE.

En cualquier caso, independientemente del número de células que lograran atravesar la red capilar pulmonar o que alcanzaran el parénquima hepático, las ASCs demostraron tener un impacto positivo y significativo sobre la supervivencia y el grado de lesión hepática, por lo que consideramos que el modelo de IHA que hemos utilizado en este trabajo es un modelo válido, por su alta reproducibilidad y sencillez en los métodos, y que aporta además el valor de la alogenicidad de las células madre utilizadas.

6.3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE LA TERAPIA CELULAR

En un espacio breve de tiempo de apenas seis meses, cuatro publicaciones — incluida la nuestra, *J Invest Surg*, 2015;28(2):120-6 —, analizan el efecto de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en modelos de insuficiencia hepática aguda (tres modelos de hepatotoxicidad y un modelo de hepatectomía parcial), y una quinta, el de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea.

El primero en ser publicado fue el trabajo de Deng et al.³⁸², “*Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells Efficiently Rescue Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Failure in Mouse*”, un modelo alogénico con ratones transgénicos para la EGFP (enhanced green fluorescent protein).

El modelo fue muy similar al nuestro ya que tanto el CCl₄ como las ASCs se administraron de la misma forma, es decir, por punción intraperitoneal e inyección a través de una vena de la cola, respectivamente.

Además de demostrar un aumento de la supervivencia en los ratones tratados con ASCs frente a los controles, así como una mejoría en la función hepática — medida por los niveles de AST y ALT —, a los siete días de la inyección, las ASCs se encontraban de forma individual en el parénquima hepático y presentaban el aspecto fusiforme característico de las células mesenquimales, mientras que a las dos semanas formaban pequeños grupos y a las cuatro semanas, masas con una morfología celular similar a los hepatocitos (*hepatocyte-like*) y expresando CK-18 y albúmina, sugiriendo por tanto la capacidad de diferenciación *in vivo* de las ASCs hacia células con función hepática. En los hígados del grupo control no se encontraron EGFP-ASCs.

Chen et al.³⁸³, en su modelo de IHA con D-galactosamina en ratas SD e inyección intraesplénica de ASCs, observaron una mejoría tanto bioquímica como histológica en el grupo de ratas tratadas, pese a que la gran mayoría de células quedaron

recluidas en el bazo, pero en el análisis de la expresión de albúmina y alfa-fetoproteína realizado a los tres días de la inyección de ASCs para observar su diferenciación hacia células hepáticas, éstas no mostraron expresión alguna de dichos marcadores.

Li et al.³⁸⁴ compararon, en un modelo de IHA mediante inyección intraperitoneal de CCl₄ (4 mL/Kg al 50%) en ratas SD, el efecto de BMSCs (células madre mesenquimales derivadas de médula ósea) nativas y de BMSCs diferenciadas *in vitro* a células hepáticas mediante un medio de cultivo con insulina-transferrina-selenio y los factores de crecimiento HGF (Hepatocyte Growth Factor) y FGF-4 (Fibroblast Growth Factor), e inyectadas a través de una vena lateral de la cola. El aumento de expresión de AFP, CK-18 y albúmina y el acúmulo de glucógeno a lo largo del tiempo, junto a la disminución posterior de AFP por maduración, confirmaron la diferenciación.

Ambos grupos de ratas tratadas con BMSCs, nativas o diferenciadas, presentaron una menor alteración de la bioquímica hepática, así como un menor grado de lesión histológica frente al grupo control, sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos tipos de células durante los catorce días de observación del estudio.

El trabajo de Saidi et al.³⁸⁵, "*Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Liver Regeneration*" es un modelo en ratón de IHA con inyección intraperitoneal de CCl₄ (4 mg/Kg) en el que se administraron ASCs de origen humano, siendo por tanto un modelo xenogénico que pone a prueba la inmunotolerancia de estas células, característica que describimos en la introducción y que resulta muy interesante, pues si se diera la situación inversa, es decir, que pudiéramos trasplantar con seguridad a pacientes células de otras especies, acabaríamos con el problema de la escasez de fuentes celulares, si bien es cierto que el tejido adiposo del que provienen las ASCs es ya de por sí una fuente ubicua, rentable y de fácil acceso.

En este estudio, los niveles de ALT e IL-6, marcadores de necrosis e inflamación, fueron significativamente menores en el grupo tratado con células y hubo menor

grado de lesión hepática. Además, en el brazo de tratamiento se encontró un mayor número de células PCNA (proliferating cell nuclear antigen) positivas — un marcador de regeneración hepática — y una mayor supervivencia. La expresión de alfa-1 antitripsina humana en los ratones que recibieron ASCs confirma la integración y viabilidad de las células.

Los autores concluyen que los efectos antiinflamatorio y estimulador de la regeneración hepática son los mecanismos principales por los cuales las ASCs mejoran la IHA.

Nuestros resultados confirman el efecto beneficioso de las ASCs en esta patología. A pesar de no existir en nuestro estudio diferencias significativas entre los grupos de IHA, con y sin tratamiento con ASCs, en cuanto al perfil bioquímico — a excepción de la FA, cuyos niveles medios fueron superiores en el grupo de tratamiento —, la supervivencia del grupo tratado fue significativamente mayor ($P = 0,026$) y correlacionable con la existencia de una atenuación en el grado de necrosis hepática. A 24h, mientras que en el grupo sin ASCs todos los hígados presentaban necrosis grado III-IV, en el grupo de terapia celular hubo casos con mínimas alteraciones histológicas.

A este último hecho ha podido contribuir la precocidad en la administración de las células madre, tan sólo treinta minutos después de la inducción del daño hepático. Numerosos trabajos demuestran la existencia de alteraciones histológicas tan pronto como dos horas después de la administración intraperitoneal de CCl_4 y la detección del metabolito $\text{CCl}_3\cdot$, por lo que la administración temprana de las ASCs puede en algunos casos haber contribuido a evitar el desarrollo de la necrosis, y en las numerosas ratas en las que no, y que presentaban por tanto necrosis grado III-IV, a evitar la mortalidad.

Asimismo, a la hora de identificar las ASCs en el parénquima hepático mediante tinción con PKH26 en nuestro caso, en los hígados de las ratas a las que no se les inyectó el tóxico y, por tanto, a las que no se les indujo IHA, no había presencia de ASCs. Por el contrario, en los hígados de las ratas a las que sí se les indujo IHA existía un gran número de ASCs, distribuidas sin formar ningún tipo de agregado

tanto a 24h, como a 48h y siete días. Desde el punto de vista fenotípico, a los siete días las ASCs localizadas en el parénquima hepático presentaban la forma fusiforme característica de las células madre de estirpe mesenquimal.

Existen estudios en los que se realiza una diferenciación *in vitro* de ASCs a células hepáticas, incluso con características diferenciadas de hepatocitos tanto periportales como pericentrales — que tienen perfiles metabólicos diferentes —, y se evidencia su integración y viabilidad una vez trasplantados³⁸⁶. Sin embargo, con excepción del trabajo de Deng et al., en el que se realizan observaciones hasta la cuarta semana después de la inducción del fallo hepático, todos los estudios en los que se observan las ASCs no diferenciadas previamente hasta un máximo de catorce días, describen células con una morfología similar a la observada directamente en los cultivos, es decir, células fusiformes parecidas a los fibroblastos. Por tanto, la diferenciación de las ASCs a células hepáticas, que parece que puede suceder *in vivo* una vez que han alcanzado el parénquima del órgano dañado, es en cualquier caso un fenómeno tardío y la funcionalidad de estas células no parece responsable de la supervivencia de los animales en la fase más aguda, cuando se produce el pico de mortalidad.

La IHA es un cuadro con multitud de causas y la etiología, como ya comentamos, es un factor decisivo en la evolución clínica. Así pues, no todos los casos de IHA son iguales y aunque se tiende a evitar los términos fulminante, hiperagudo, subagudo, etc., la IHA a consecuencia de toxicidad directa por fármacos (DILI) tiene generalmente un curso más explosivo, con una elevación y descenso de las transaminasas muy brusco y un pico de mortalidad muy precoz, en comparación con la IHA producida por infecciones virales, por ejemplo.

En casos de DILI, como en nuestro modelo, en consecuencia, no existe el tiempo necesario para que se produzca una diferenciación celular y son los mecanismos inmunomoduladores los que predominan y tienen relevancia clínica. Las MSCs tienen un efecto paracrino sobre las células parenquimatosas y no parenquimatosas del hígado, estimulando la proliferación y diferenciación celular, la angiogénesis y atenuando la respuesta inflamatoria y la muerte celular³⁸⁷. Es

6. DISCUSIÓN

conocido que las MSCs liberan multitud de moléculas, a los que de forma global se les denomina secretoma, entre los cuales se encuentran factores de crecimiento, además de microvesículas con moléculas de mRNA y microRNA.

Más aún, las citoquinas producidas son diferentes según el tipo de patología, demostrando la capacidad de las MSCs de identificar los mecanismos implicados en la lesión orgánica y responder de una manera específica³⁸⁸ (tabla 38). Sin embargo, *in vivo*, algunos de los factores detectados se desconoce si son producidos directamente por las MSCs o por células del huésped inducidas por las MSCs.

Patología/ Modelo	Mecanismo	Fuente MSCs	Especie	Factores secretados	Efecto biológico
Fibrosis	CCl ₄	MO Ratón	Ratón	BMP7	antifibrótico
	CCl ₄ /LCB	MO H	Ratón	IL-6, IL-1Ra, IGFBP-2	antifibrótico/ antiapoptótico
	CCl ₄	MO Ratón	Ratón	iNOS	antifibrótico
	CCl ₄		Ratón	MMP9	antifibrótico
	CCl ₄	MO Ratón	Ratón	EGFR, IL-1Ra, MMP9	antifibrótico
	CCl ₄	MO Ratón	Ratón	Dlk1	antifibrótico/ inactivación HSC
Resección	70%	Hígado H	Ratón	TNFα, HGF, TGFβ, IL-10, IL-1Ra, IL-6, VEGFa, VEGF-R1, VEGF-R2, Ang1	pro-proliferativo pro-angiogénico anti-inflamatorio
	90%	TA Rata (diferenciación hepática)	Rata	C2, Fosfatidilcolinas	corrección metabólica pro-proliferativo
IHA	Paracetamol	Cordón umbilical H	Ratón	TNFα, IL-6, HGF, GSH, BCL2	anti-inflamatorio anti-oxidante anti-apoptótico
	Concanavalina A	Amígdala H	Ratón	Galectina-1	inmunomodulación
	Paracetamol	TA H	Rata	TNFα, MCP1, IL-1β, ICAM-1, Ciclina-D1	anti-oxidante anti-inflamatorio pro-proliferativo
	P. acnes/LPS	Ratón	Ratón	Prostaglandina E	inmunomodulación
	D-galactosamina	MO H	Mini-Pig	Ácidos biliares, LPC, PC, SM, Triptófano	corrección metabólica
	CCl ₄	Líquido amniótico H	Ratón	IL-10, IL-1Ra, IL-13, IL-27	anti-inflamatorio
NASH	DDMC	MO H (diferenciación hepática)		TNFα, Lipocalina-2	anti-inflamatorio
	DRG	MO Ratón	Ratón	TNFα, TGFβ-1	anti-inflamatorio
	DRG	TA H	Ratón	TNFα, Leptina, Glut4	anti-inflamatorio corrección metabólica

Tabla 38. Resumen selectivo de los factores estimulados por las MSCs en diferentes patologías hepáticas. **Ang1**, angioprotein 1; **BCL2**, B cell lymphoma 2; **BMP7**, bone morphogenic protein 7; **C2**, acetilcarnitina; **DDMC**, dieta deficiente en metionina-colina; **Dlk1**, Delta-like 1; **DRG**, dieta rica en grasa; **EGFR**, epidermal growth factor receptor; **Glut4** glucose transporter type 4; **GSH**, glutatión; **H**, humano/a; **HGF**, hepatocyte growth factor; **ICAM-1**, intercellular adhesion molecule 1; **IGFBP-2**, insulin-like growth factor binding protein 2; **IL-1Ra**, 6, 10, 13, 27, Interleuquina 1Ra, 6, 10, 13, 27; **iNOS**, induced nitric oxide synthase; **LCB**, ligadura conducto biliar; **LPC**, lipofosfatidilcolina; **MCP1**, monocyte chemotactic protein 1; **MMP9**, matrix metalloproteinase 9; **MO**, médula ósea; **PC**, fosfatidilcolina; **SM**, esfingomielina; **TA** tejido adiposo; **TGFβ**, transforming growth factor β; **TNFα**, tumor necrosis factor α; **VEGFa**, **R1**, **R2**, vascular endothelial growth factor a, R1, R2.

Modificado de Christ et al., 2015³⁸⁸.

Tras la fase aguda, en la que la inmunomodulación — atenuación de la respuesta inflamatoria e inhibición de los fenómenos de apoptosis — actúa como un muro de contención, impidiendo la perpetuación del daño hepático, el estímulo de las ASCs a la proliferación, así como el soporte metabólico, constituirían un segundo paso favorecedor de la regeneración hepática. Uno de los estudios recientemente publicados de IHA tras una hepatectomía del 90% en ratas a las que se les administra MSCs derivadas de la grasa peritoneal y diferenciadas previamente *in vitro* a células hepáticas, demuestra una mayor supervivencia y una mejor función hepática gracias fundamentalmente a un mejor metabolismo de lípidos y aminoácidos. Parece que el mecanismo subyacente es un estímulo paracrino mediado por las ASCs³⁸⁹. Este soporte metabólico era ya conocido previamente en modelos de insuficiencia hepática crónica, aunque sus mecanismos no eran conocidos, si bien el simple hecho de la cantidad de células trasplantadas — habitualmente entre un 5% y un 10% de la masa hepática — desacredita la idea de que dicha mejoría se debiera a un soporte metabólico directamente aportado por las células trasplantadas y, por tanto, de una diferenciación hepática eficaz.

Posteriormente, una vez que el individuo sobrevive a los momentos críticos iniciales, la diferenciación celular podría ser considerado otro factor sinérgico de la regeneración hepática, aunque más como un acelerador del proceso que como un fenómeno estrictamente necesario, ya que sin ella los animales sobreviven y alcanzan una recuperación completa igualmente — a los siete días de la inducción del fallo hepático, la histología hepática era completamente normal con la tinción de HE — o como un hecho independiente, es decir, que las ASCs tenderían a integrarse en el órgano como una célula residente más, adquiriendo la forma y función de las células de su entorno.

Probablemente, la existencia de un daño previo y de citoquinas proinflamatorias juegue un papel importante en la estimulación de esta diferenciación *in vivo*, del mismo modo que estos factores son imprescindibles para que se produzca el reclutamiento celular, demostrada en múltiples estudios, incluido el nuestro, pese a los filtros pulmonar y esplénico. El hígado dañado con CCl₄ sobreexpresa SDF-1 (stromal cell derived factor), que es la molécula de unión específica del receptor

CXCR4 que se encuentra en las MSCs y es el responsable de su migración y reclutamiento³⁸⁸.

La ruta de administración celular ha sido un motivo de debate e investigación continuo. En base a algunos trabajos como el de Gupta et al. en el que se utilizan hepatocitos — los comienzos de la terapia celular en las enfermedades hepáticas comenzó con el uso exclusivo de estas células —, algunos autores afirman que la forma más eficaz de que las células trasplantadas se integren en el parénquima hepático es su administración intrasinusoidal.

La administración intraparenquimatosa hepática tiene el riesgo de inyectar las células en el territorio de drenaje suprahepático y, por tanto, de alcanzar los capilares pulmonares provocando émbolos. La administración intraarterial, que supone un alto flujo sanguíneo podría, teóricamente, destruir un importante número de células por fuerzas de fricción. Sin embargo, el uso de un sistema de baja presión como el venoso, que alcance los sinusoides hepáticos — lo que queda limitado al eje esplenoportal — acompañado de interacciones con componentes de la matriz extracelular, como sucede en los sinusoides hepáticos o esplénicos, y que se ha demostrado que favorecen la integración celular, parece ser la forma más eficaz de lograr la distribución e integración de los hepatocitos trasplantados.

Estudios de gran calidad como el de Fischer et al.¹⁸⁵, demuestran que una gran cantidad de MSCs quedan atrapadas en la red capilar pulmonar tras su administración por vía venosa periférica, como sucedió también en nuestro estudio y comentamos en el anterior apartado.

Sin embargo, pese a este hecho, la pequeña fracción de ASCs capaz de superar el filtro pulmonar, como lo demuestran todos los trabajos expuestos con anterioridad que utilizan esta vía, incluido el nuestro, es suficiente para alcanzar el órgano diana y además, producir diferentes efectos, a destacar el aumento de la supervivencia.

Dado que los efectos provocados por las ASCs se deben fundamentalmente a la liberación y modulación de citoquinas y factores de crecimiento, probablemente, las células atrapadas en otros órganos sean capaces de seguir secretando dichas

sustancias a distancia, en respuesta a las sustancias proinflamatorias circulantes de forma sistémica por la lesión hepática. Se trata, en cualquier caso, de una vía de administración segura y eficaz.

Otra cuestión muy interesante e importante sobre el posible futuro uso clínico de las MSCs es la fuente a partir de la cual se obtienen y el método de cultivo utilizado. Estos dos factores pueden influenciar la eficacia terapéutica de las MSCs. Como demostraron Rennert et al.³⁹⁰, las ASCs procedentes de ratones diabéticos fueron incapaces de estimular la neovascularización y cicatrización en un modelo de isquemia de partes blandas por incapacidad de inducir la angiogénesis.

Además, el ambiente en el que las MSCs se integran es fundamental para su diferenciación y secreción paracrina, por lo que es un factor clave para el éxito del trasplante. Por ello, actualmente muchos trabajos se centran en la optimización de la administración de MSCs, añadiendo factores de crecimiento, citoquinas o incluso biomateriales para asociar nutrientes y mejorar la supervivencia celular³⁹¹.

De la misma manera que los factores secretados por las MSCs tienen efectos pleiotrópicos, es posible que los factores de crecimiento que se añaden al medio de cultivo o que se administran de forma asociada puedan tener influencia sobre la capacidad final de las células.

Otra cuestión no resuelta por la heterogeneidad de los datos disponibles es el posible efecto carcinogénico de las MSCs, ya que existe contradicción en la literatura, pues se han observado efectos tanto supresores como estimulantes del crecimiento tumoral³⁹². Existen multitud de mecanismos a través de los cuales las MSCs interactúan con las células tumorales, entre los cuales destacan el efecto indirecto de la inmunosupresión mediada por estas células sobre la biología tumoral — proliferación, capacidad de metastatizar, etc. — y el estímulo o supresión directos³⁸⁷.

Parece que un posible factor clave sobre el efecto supresor o estimulante de las MSCs es el tiempo en el cual se administran con respecto al tumor. Los estudios en los que se han administrado cuando el tumor existía previamente han demostrado

un efecto supresor por parte de las células madre, mientras que los estudios en los que se han administrado conjuntamente MSCs y células tumorales para inducir la formación del tumor, el crecimiento tumoral ha sido mayor que cuando se aplican células tumorales solas³⁹².

Ninguno de los pacientes tratados hasta la fecha con MSCs, por diversas patologías, ha desarrollado un tumor de novo y, en general, se considera una terapia segura. Las MSCs han sido utilizadas, si hablamos de patología hepática, en pacientes cirróticos (tabla 14), así como en IHA y otras enfermedades — hepatitis autoinmune, etc. —, pero no aún tumores. Sin embargo, existen ensayos clínicos con MSCs en otros campos de la oncología para tratar, por ejemplo, el cáncer de ovario (NCT02068794), tumores de cabeza y cuello (NCT02079324) y el cáncer de próstata (NCT01983709)³⁹³.

Además, dado el tropismo que las MSCs tienen por los tumores, existen ya líneas de investigación en las que se pretende utilizar estas células como vehículos para la dispensación de terapias oncológicas — fármacos, terapia génica —³⁹³.

Sin embargo, debemos ser aún precavidos a la hora de utilizar las MSCs en clínica, especialmente en pacientes de alto riesgo con condiciones premalignas — cirrosis y asociación con hepatocarcinoma —, puesto que ni siquiera sabemos el tiempo que persisten las MSCs *in vivo* y, por tanto, la duración de sus efectos y la transformación maligna durante el cultivo *ex vivo* ha sido descrita³⁹⁴.

Así pues, en resumen, la terapia celular en la IHA así como en otras afecciones hepáticas, merced al mayor conocimiento de las bases fisiopatológicas de dichos trastornos y a los problemas relacionados con las fuentes de hepatocitos — mala calidad por procedencia de hígados descartados para TH, escasez, pérdida por criopreservación —, está desplazándose, en palabras de Christ et al.³⁸⁸, del abordaje inicial basado únicamente en el soporte metabólico mediante el trasplante de hepatocitos — la unidad mínima funcional del hígado — a un abordaje más mecanicista que intenta actuar directamente sobre los mecanismos celulares y moleculares de lesión hepática.

6. DISCUSIÓN

Dentro de este último encuadre se halla la terapia celular con células madre mesenquimales y, específicamente, aquellas derivadas de tejido adiposo, que merced a sus efectos inmunomoduladores, proliferativos, antiapoptóticos y de soporte metabólico son capaces, como se ha descrito en numerosos estudios y en nuestro trabajo, de plantear una alternativa a los tratamientos actuales de la insuficiencia hepática aguda.

Aún no comprendemos del todo las interacciones de estas células en algunos escenarios, como en la patología tumoral, pero los datos clínicos actualmente disponibles la avalan como una terapia segura.

Dada las particularidades de la IHA, como su predilección por pacientes jóvenes y su mortalidad precoz, es difícil plantear estudios a nivel clínico en los que el único tratamiento, además de las medidas de soporte universales, sea la administración de ASCs. Sin embargo, la combinación de terapias puede ser una línea futura de investigación, puesto que los dispositivos bioartificiales pueden dar un soporte metabólico de una forma probablemente más precoz que las ASCs y, estas últimas, contribuir a un mejor control de la respuesta inflamatoria, ya que muchas citoquinas no son filtradas por estos sistemas, y a un estímulo de la autorregeneración. De esta forma podríamos rescatar un mayor número de pacientes de las listas de trasplante hepático y ofrecer una supervivencia a largo plazo mejor de la actual en ausencia del trasplante.

Además, la terapia celular no es un tratamiento “one shot”, es decir, un recurso que sólo puede ser utilizado una vez, sino que podrían realizarse administraciones periódicas dando así una mayor cobertura al proceso de recuperación y teniendo, probablemente, un efecto beneficioso sobre la supervivencia global.

¿Estamos por tanto preparados para realizar el salto a la fase clínica? La evidencia preclínica es enorme y sólida, luego la respuesta creemos que es sí, aunque existen algunas cuestiones previas importantes que deben de tenerse en cuenta y resolverse, como la protocolización de los cultivos celulares y la fuente de obtención, por su posible impacto en la eficacia o como la dificultad de reclutamiento de pacientes por la baja incidencia de la IHA. Para contrarrestar esto

último, sería necesario hacer estudios con carácter multicéntrico — con la mayor complejidad que implica— y posiblemente, teniendo que hacer extensivo el estudio a pacientes con AoCLF, aunque la cirrosis como enfermedad de base, que constituye un espectro muy amplio y complejo de patología, sin duda añadiría factores de confusión que deberían ser tenidos en cuenta a la hora del análisis de resultados.

Así pues, los resultados de nuestro trabajo constituyen una prueba de concepto — entendida como una implementación resumida e incompleta, de un método o de una idea, realizada con el propósito de verificar que el concepto o teoría en cuestión es susceptible de ser explotada de una manera útil — válida para continuar con la investigación de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo en el tratamiento de a insuficiencia hepática aguda.

7. CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. La administración intraperitoneal de 5 mL/Kg de tetracloruro de carbono al 25% disuelto en aceite de oliva virgen en ratas Sprague-Dawley provoca una insuficiencia hepática aguda, demostrable por el patrón bioquímico a las 24h e histológicamente por la presencia de necrosis en zona 3 perivenular, con elevada mortalidad y es, por tanto, un modelo eficaz y reproducible de insuficiencia hepática aguda.
2. Los niveles séricos de ALT, AST, FA y B_T tras la administración de CCL₄, no se correlacionan con la intensidad del daño hepático a nivel histológico.
3. En ausencia de daño hepático, las ASCs inyectadas por vía venosa periférica no penetran en el hígado y sí se distribuyen por pulmón y bazo. Al contrario, ante la presencia de una agresión hepática, una gran cantidad de ASCs penetran y se distribuyen en el parénquima hepático y, en menor medida, en pulmón y bazo con diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con y sin IHA, por lo que existe un fenómeno de reclutamiento celular.
4. Existe una tendencia a la elevación de la FA a las 48h en el grupo de daño con CCL₄ y tratamiento con ASCs respecto al resto de grupos, que resulta significativa cuando se compara con el grupo de daño sin tratamiento. La elevación de FA se asocia a la capacidad regenerativa del hígado, por lo que la tendencia observada en nuestro estudio podría deberse a una estimulación de la regeneración hepática.
5. La administración alogénica de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, mediante inyección en el sistema venoso periférico, en ratas Sprague-Dawley con insuficiencia hepática aguda inducida por inyección intraperitoneal de CCL₄, aumenta de forma significativa la supervivencia.

8. RESUMEN

La insuficiencia hepática aguda es una entidad clínica poco frecuente, pero muy grave, resultado de una pérdida masiva de hepatocitos por necrosis, que compromete las funciones de síntesis, metabolismo y detoxificación del hígado.

La necrosis hepatocitaria puede estar causada por fármacos — reacción idiosincrásica o sobredosis — o virus hepatotropos habitualmente, aunque en cerca de un tercio de los casos, la causa es desconocida. En España y en los países de la cuenca mediterránea predominan como agente causal la infección por VHB, siendo la intoxicación por paracetamol la etiología más común en los países occidentales.

Hasta la introducción del trasplante hepático en la práctica clínica, la mortalidad global de la IHA era superior al 85% pese a los avances en los cuidados de soporte intensivos. Actualmente la mortalidad se ha reducido hasta un 35%, aunque la etiología es un factor pronóstico fundamental.

La escasez de donantes, la dificultad de seleccionar adecuadamente a los receptores y las complicaciones asociadas al trasplante — estenosis biliares, rechazo hiperagudo, agudo o crónico, inmunosupresión de por vida, infecciones, etc. — junto a la juventud de la mayoría de los pacientes han obligado a buscar tratamientos alternativos, entre los que destacan los dispositivos de soporte hepático y la terapia celular.

Los dispositivos de soporte hepático se basan en el principio de la hemodiálisis, filtrando del plasma la mayor cantidad de sustancias tóxicas que el hígado no puede retirar de la circulación sistémica, por medio de una membrana de intercambio de albúmina generalmente. A caballo entre los primeros dispositivos y la terapia celular pura están los dispositivos bioartificiales, que con un biorreactor en el que se alojan células con función hepática — hepatocitos porcinos en la mayoría de los casos —, pretenden dar también soporte metabólico.

Sin embargo, ninguno de estos dispositivos, pese a ser eficaces en parámetros concretos como en la estabilización hemodinámica o en la disminución de la encefalopatía hepática, ha demostrado aumentar la supervivencia a largo plazo.

8. RESUMEN

La terapia celular en la IHA constituye un campo novedoso, pero del que ya poseemos gran cantidad de información, tanto de estudios experimentales como de ensayos clínicos.

En sus primeras etapas, el objetivo a lograr era repoblar el órgano dañado con células nuevas capaces de realizar las funciones propias del hígado, por lo que se realizaron trabajos con hepatocitos humanos siendo pronto evidentes las dificultades de encontrar fuentes de calidad y de mantener la viabilidad y función celulares tras el proceso de criopreservación.

Estos problemas parecen tener solución con el descubrimiento de las células madre pluripotenciales inducidas, capaces de diferenciarse in vitro a células de estirpe hepática, sin embargo, a día de hoy aún desconocemos cómo diferenciarlas produciendo réplicas exactas de hepatocitos maduros y sus funciones biológicas son limitadas.

Es preciso un nuevo enfoque y surge así la terapia con células madres mesenquimales, una línea celular de la cual ya conocíamos algunas propiedades importantes, merced a estudios realizados en otras patologías, como la de moduladoras de la inflamación y del sistema inmune.

En los numerosos estudios referenciados en este trabajo, se describen múltiples propiedades de las MSCs, como estimulantes de la proliferación celular, antiapoptóticas, microbicidas, sin embargo, la capacidad de contener la respuesta inflamatoria es el denominador común y el factor determinante que permite aumentar de forma significativa la supervivencia.

El objetivo de nuestro proyecto es realizar un estudio experimental sobre la potencial aplicabilidad de la terapia celular en el tratamiento de la insuficiencia hepática aguda y, concretamente, mediante el uso de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

De esta forma, además de las bondades características de las MSCs, añadimos el valor de la fuente de la cual se obtienen, el tejido celular subcutáneo, que es ubicuo y fácilmente accesible, así como establecer un modelo alogénico, demostrando el potencial uso de células procedentes de un sujeto distinto del paciente, que

aumenta la disponibilidad de la fuente, y con una vía de administración — la vía venosa periférica —, mínimamente invasiva y sobre todo, sencilla.

El modelo de IHA que hemos desarrollado mediante inducción por inyección intraperitoneal de tetracloruro de carbono en ratas macho Sprague-Dawley es un modelo sencillo, eficaz y reproducible y los resultados del tratamiento realizado con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo alogénicas ponen de manifiesto que se trata de una vía de investigación que tiene potencial para trasladarse a la práctica clínica, con todas las limitaciones y dificultades que, sin duda, será necesario superar.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. Acute liver failure. *Lancet*. 2010;376(9736):190–201.
2. Lee WM, Larson AM, Stravitz RT. AASLD Position Paper: The Management of Acute Liver Failure: Update 2011.
3. Canbay A, Tacke F, Hadem J, Trautwein C, Gerken G, Manns MP. Acute liver failure: a life-threatening disease. *Dtsch Arztebl Int*. 2011;108(42):714–20.
4. Palmes D, Skawran S, Spiegel H-U. Acute liver failure: from bench to bedside. *Transplant Proc*. 2005;37(3):1628–31.
5. Williams R. Correction of disturbed pathophysiology of hepatic failure by albumin dialysis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2008;7(1):19–24.
6. Quaglia A, Portmann BC, Knisely AS, Knisely AS, Srinivasan P, Muiesan P, Wendon J, Heneghan MA, O'Grady JG, Samyn M, Hadzic D, Dhawan A, Mieli-Vergani G, Heaton N, Rela M. Auxiliary transplantation for acute liver failure: Histopathological study of native liver regeneration. *Liver Transpl*. 2008;14(10):1437–48.
7. Karvellas CJ, Todd Stravitz R, Battenhouse H, Lee WM, Schilsky ML. Therapeutic hypothermia in acute liver failure: a multicenter retrospective cohort analysis. *Liver Transpl*. 2015;21(1):4–12.
8. Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res*. 2012;35(2):213–21.
9. Soleymaninejadian E, Pramanik K, Samadian E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: cytokines and factors. *Am J Reprod Immunol*. 2012;67(1):1–8.
10. De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, Arnalich-Montiel F. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med*. 2012;12(5):574–91.
11. Ho MSH, Mei SHJ, Stewart DJ. The Immunomodulatory and Therapeutic Effects of Mesenchymal Stromal Cells for Acute Lung Injury and Sepsis. *J Cell Physiol*. 2015;230(11):2606–17.
12. Estrategia de búsqueda en PubMed: (("stem cell"[Text Word]) AND "acute liver failure"[Text Word]) AND "treatment"[Text Word]. 2015.
13. García-Olmo D, García-Arranz M, García LG, Cuellar ES, Blanco IF, Prianes LA, Montes JAR, Pinto FL, Marcos DH, García-Sancho L. Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy. *Int J Colorectal Dis*. 2003;18(5):451–4.
14. García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum*. 2005;48(7):1416–23.
15. Alvarez PD-A, García-Arranz M, Georgiev-Hristov T, García-Olmo D. A new bronchoscopic treatment of tracheomediastinal fistula using autologous adipose-derived stem cells. *Thorax*. 2008;63(4):374–6.

9. BIBLIOGRAFÍA

16. Pascual I, de Miguel GF, Gómez-Pinedo UA, de Miguel F, Arranz MG, García-Olmo D. Adipose-derived mesenchymal stem cells in biosutures do not improve healing of experimental colonic anastomoses. *Br J Surg.* 2008;95(9):1180–4.
17. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, De-La-Quintana P, Garcia-Arranz M, Pascual M. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum.* 2009;52(1):79–86.
18. Pascual I, Fernández de Miguel G, García Arranz M, García-Olmo D. Biosutures improve healing of experimental weak colonic anastomoses. *Int J Colorectal Dis.* 2010;25(12):1447–51.
19. Georgiev-Hristov T, García-Arranz M, García-Gómez I, García-Cabezas MA, Trébol J, Vega-Clemente L, Díaz-Agero P, García-Olmo D. Sutures enriched with adipose-derived stem cells decrease the local acute inflammation after tracheal anastomosis in a murine model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2012;42(3):e40–7.
20. Riera del Moral L, Largo C, Ramirez JR, Vega Clemente L, Fernández Heredero A, Riera de Cubas L, Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M. Potential of mesenchymal stem cell in stabilization of abdominal aortic aneurysm sac. *J Surg Res.* 2015;195(1):325–33.
21. Trey C, Davidson CS. The management of fulminant hepatic failure. *Prog Liver Dis.* 1970;3:282–98.
22. Wlodzimierz KA, Eslami S, Abu-Hanna A, Nieuwoudt M, Chamuleau RAFM. Systematic review: acute liver failure - one disease, more than 40 definitions. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;35(11):1245–56.
23. O'Grady JG, Schalm SW, Williams R. Acute liver failure: redefining the syndromes. *Lancet.* 1993;342(8866):273–5.
24. Bernuau J, Rueff B, Benhamou J. Fulminant and subfulminant liver failure: definitions and causes. *Semin Liver Dis.* 1986;6(2):97–106.
25. Mochida S, Nakayama N, Matsui A, Nagoshi S, Fujiwara K. Re-evaluation of the Guideline published by the Acute Liver Failure Study Group of Japan in 1996 to determine the indications of liver transplantation in patients with fulminant hepatitis. *Hepatol Res.* 2008;38(10):970–9.
26. Sen S, Williams R, Jalan R. The pathophysiological basis of acute-on-chronic liver failure. *Liver.* 2002;22 Suppl 2:5–13.
27. Arroyo V, Moreau R, Jalan R, Ginès P. Acute-on-chronic liver failure: A new syndrome that will re-classify cirrhosis. *J Hepatol.* 2015;62(1):S131–43.
28. Moreau R, Jalan R, Arroyo V. Acute-on-Chronic Liver Failure: Recent Concepts. *J Clin Exp Hepatol.* 2015;5(1):81–5.
29. Bernal W, Wendon J. Acute Liver Failure. *N Engl J Med.* 2013;369(26):2525–34.
30. Acharya SK, Batra Y, Hazari S, Choudhury V, Panda SK, Dattagupta S.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Etiopathogenesis of acute hepatic failure: Eastern versus Western countries. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002;17 Suppl 3:S268–73.
31. Ichai P, Samuel D. Etiology and prognosis of fulminant hepatitis in adults. *Liver Transpl.* 2008;14 Suppl 2:S67–79.
 32. Escorsell A, Mas A, de la Mata M. Acute liver failure in Spain: analysis of 267 cases. *Liver Transpl.* 2007;13(10):1389–95.
 33. Patra S, Kumar A, Trivedi SS, Puri M, Sarin SK. Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Ann Intern Med.* 2007;147(1):28–33.
 34. Arends JE, Ghisetti V, Irving W, Dalton HR, Izopet J, Hoepelman AIM, Salmon D. Hepatitis E: An emerging infection in high income countries. *J Clin Virol.* 2014;59(2):81–8.
 35. Levitsky J, Duddempudi AT, Lakeman FD, Whitley RJ, Luby JP, Lee WM, Fontana RJ, Blei AT, Ison MG. Detection and diagnosis of herpes simplex virus infection in adults with acute liver failure. *Liver Transpl.* 2008;14(10):1498–504.
 36. Härmä M, Höckerstedt K, Lautenschlager I. The long-term outcomes of patients transplanted due to acute liver failure with hepatic human herpesvirus-6 infection. *Transplant Proc.* 2013;45(5):1910–2.
 37. Huang RJ, Varr BC, Triadafilopoulos G. Acute fulminant hepatic failure associated with parvovirus B19 infection in an immunocompetent adult. *Dig Dis Sci.* 2012;57(11):2811–3.
 38. Bathla L, Grant WJ, Mercer DF, Vargas LM, Gebhart CL, Langnas AN. Parvovirus associated fulminant hepatic failure and aplastic anemia treated successfully with liver and bone marrow transplantation. A report of two cases. *Am J Transplant.* 2014;14(11):2645–50.
 39. Alvite-Canosa M, Paniagua-Martín MJ, Quintela-Fandiño J, Otero A, Crespo-Leiro MG. Fulminant hepatic failure due to varicella zoster in a heart transplant patient: successful liver transplant. *J Heart Lung Transplant.* 2009;28(11):1215–6.
 40. Verleden GM, Vos R, Van Raemdonck DE, Laleman W, Vanaudenaerde BM. Acute liver failure due to Varicella zoster virus infection after lung transplantation: a case report. *Transplant Proc.* 2012;44(5):1457–9.
 41. Mellinger JL, Rossaro L, Naugler WE, Nadig SN, Appelman H, Lee WM, Fontana RJ. Epstein-Barr virus (EBV) related acute liver failure: a case series from the US Acute Liver Failure Study Group. *Dig Dis Sci.* 2014;59(7):1630–7.
 42. Dahlin DC, Miwa GT, Lu AY, Nelson SD. N-acetyl-p-benzoquinone imine: a cytochrome P-450-mediated oxidation product of acetaminophen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(5):1327–31.
 43. Ellis A, Wendon J. Circulatory, respiratory, cerebral, and renal derangements in acute liver failure: pathophysiology and management. *Semin Liver Dis.* 1996;16(4):379–88.

9. BIBLIOGRAFÍA

44. Wilkinson SP, Blendis LM, Williams R. Frequency and type of renal and electrolyte disorders in fulminant hepatic failure. *Br Med J*. 1974;1(5900):186–9.
45. Ring-Larsen H, Palazzo U. Renal failure in fulminant hepatic failure and terminal cirrhosis: a comparison between incidence, types, and prognosis. *Gut*. 1981;22(7):585–91.
46. O’Grady JG, Alexander GJ, Hayllar KM, Williams R. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology*. 1989;97(2):439–45.
47. Jain S, Pendyala P, Varma S, Sharma N, Joshi K, Chawla Y. Effect of renal dysfunction in fulminant hepatic failure. *Trop Gastroenterol*. 21(3):118–20.
48. Weigert AL, Schafer AI. Uremic bleeding: pathogenesis and therapy. *Am J Med Sci*. 1998;316(2):94–104.
49. Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy: definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology*. 2002;35(3):716–21.
50. Tapper EB, Jiang ZG, Patwardhan VR. Refining the Ammonia Hypothesis: A Physiology-Driven Approach to the Treatment of Hepatic Encephalopathy. *Mayo Clin Proc*. 2015;90(5):646–58.
51. Albrecht J, Zielińska M, Norenberg MD. Glutamine as a mediator of ammonia neurotoxicity: A critical appraisal. *Biochem Pharmacol*. 2010;80(9):1303–8.
52. Boks AL, Brommer EJ, Schalm SW, Van Vliet HH. Hemostasis and fibrinolysis in severe liver failure and their relation to hemorrhage. *Hepatology*. 6(1):79–86.
53. Agarwal B, Wright G, Gatt A, Riddell A, Vemala V, Mallett S, Chowdary P, Davenport A, Jalan R, Burroughs A. Evaluation of coagulation abnormalities in acute liver failure. *J Hepatol*. 2012;57(4):780–6.
54. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer*. 1981;47(1):207–14.
55. Habib M, Roberts LN, Patel RK, Wendon J, Bernal W, Arya R. Evidence of rebalanced coagulation in acute liver injury and acute liver failure as measured by thrombin generation. *Liver Int*. 2014;34(5):672–8.
56. Bienholz A, Canbay A, Saner FH. Coagulation management in patients with liver disease. *Med Klin Intensivmed Notfmed*. 2015;(Epub ahead of print).
57. Stravitz R, Lisman T, Luketic V, Sterling R, Puri P, Fuchs M, Ibrahim A, Lee W, Sanyal A. Minimal effects of acute liver injury/acute liver failure on hemostasis as assessed by thromboelastography. *J Hepatol*. 2012;56(1):129–36.
58. Kumar R, Bhatia V. Structured approach to treat patients with acute liver failure: A hepatic emergency. *Indian J Crit Care Med*. 2012;16(1):1–7.
59. O’Grady JG. Acute liver failure. *Postgrad Med J*. 2005;81(953):148–54.

9. BIBLIOGRAFÍA

60. Ware AJ, D'Agostino AN, Combes B. Cerebral edema: a major complication of massive hepatic necrosis. *Gastroenterology*. 1971;61(6):877–84.
61. Thumburu KK, Taneja S, Vasishta RK, Dhiman RK. Neuropathology of acute liver failure. *Neurochem Int*. 2012;60(7):672–5.
62. Muñoz SJ. Difficult management problems in fulminant hepatic failure. *Semin Liver Dis*. 1993;13(4):395–413.
63. Gazzard BG, Portmann B, Murray-Lyon IM, Williams R. Causes of death in fulminant hepatic failure and relationship to quantitative histological assessment of parenchymal damage. *Q J Med*. 1975;44(176):615–26.
64. Silk DB, Trewby PN, Chase RA, Mellon PJ, Hanid MA, Davies M, Langley PG, Wheeler PG, Williams R. Treatment of fulminant hepatic failure by polyacrylonitrile-membrane haemodialysis. *Lancet (London, England)*. 1977;2(8027):1–3.
65. Lee WM, Squires RH, Nyberg SL, Doo E, Hoofnagle JH. Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology*. 2008;47(4):1401–15.
66. Chan G, Taqi A, Marotta P, Levstik M, McAlister V, Wall W, Quan D. Long-term outcomes of emergency liver transplantation for acute liver failure. *Liver Transpl*. 2009;15(12):1696–702.
67. Klatzo I. Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1967;26(1):1–14.
68. O'Brien CJ, Wise RJ, O'Grady JG, Williams R. Neurological sequelae in patients recovered from fulminant hepatic failure. *Gut*. 1987;28(1):93–5.
69. Rolando N, Harvey F, Brahm J, Philpott-Howard J, Alexander G, Gimson A, Casewell M, Fagan E, Williams R. Prospective study of bacterial infection in acute liver failure: an analysis of fifty patients. *Hepatology*. 1990;11(1):49–53.
70. Rolando N, Gimson A, Wade J, Philpott-Howard J, Casewell M, Williams R. Prospective controlled trial of selective parenteral and enteral antimicrobial regimen in fulminant liver failure. *Hepatology*. 1993;17(2):196–201.
71. Rolando N, Harvey F, Brahm J, Philpott-Howard J, Alexander G, Casewell M, Fagan E, Williams R. Fungal infection: a common, unrecognised complication of acute liver failure. *J Hepatol*. 1991;12(1):1–9.
72. Shalimar. Antibiotics in Acute Liver Failure (ALF). *J Clin Exp Hepatol*. 2015;5(1):95–7.
73. Almasio PL, Hughes RD, Williams R. Characterization of the molecular forms of fibronectin in fulminant hepatic failure. *Hepatology*. 6(6):1340–5.
74. Possamai LA, Thursz MR, Wendon JA, Antoniadis CG. Modulation of monocyte/macrophage function: a therapeutic strategy in the treatment of acute liver failure. *J Hepatol*. 2014;61(2):439–45.
75. Rolando N, Wade J, Davalos M, Wendon J, Philpott-Howard J, Williams R. The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. *Hepatology*. 2000;32(4 Pt 1):734–9.

9. BIBLIOGRAFÍA

76. Vaquero J, Polson J, Chung C, Helenowski I, Schiodt F V, Reisch J, Lee WM, Blei AT. Infection and the progression of hepatic encephalopathy in acute liver failure. *Gastroenterology*. 2003;125(3):755–64.
77. Feng H-L, Li Q, Wang L, Yuan G-Y, Cao W-K. Indocyanine green clearance test combined with MELD score in predicting the short-term prognosis of patients with acute liver failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2014;13(3):271–5.
78. Shalimar, Acharya SK. Management in acute liver failure. *J Clin Exp Hepatol*. 2015;5(Suppl 1):S104–15.
79. Bechmann LP, Jochum C, Kocabayoglu P, Sowa J-P, Kassalik M, Gieseler RK, Saner F, Paul A, Trautwein C, Gerken G, Canbay A. Cytokeratin 18-based modification of the MELD score improves prediction of spontaneous survival after acute liver injury. *J Hepatol*. 2010;53(4):639–47.
80. Detry O, De Roover A, Delwaide J, Hans M-F, Canivet J-L, Meurisse M, Honoré P. Prolonged anhepatic state after early liver graft removal. *Hepatogastroenterology*. 54(79):2109–12.
81. Leventhal TM, Liu KD. What a Nephrologist Needs to Know About Acute Liver Failure. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2015;22(5):376–81.
82. Davenport A, Will EJ, Davidson AM. Improved cardiovascular stability during continuous modes of renal replacement therapy in critically ill patients with acute hepatic and renal failure. *Crit Care Med*. 1993;21(3):328–38.
83. Davenport A. Continuous renal replacement therapies in patients with liver disease. *Semin Dial*. 22(2):169–72.
84. Vilstrup H, Amodio P, Bajaj J, Cordoba J, Ferenci P, Mullen KD, Weissenborn K, Wong P. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. *Hepatology*. 2014;60(2):715–35.
85. Blei AT, Olafsson S, Webster S, Levy R. Complications of intracranial pressure monitoring in fulminant hepatic failure. *Lancet (London, England)*. 1993;341(8838):157–8.
86. Keays RT, Alexander GJ, Williams R. The safety and value of extradural intracranial pressure monitors in fulminant hepatic failure. *J Hepatol*. 1993;18(2):205–9.
87. Vaquero J, Fontana RJ, Larson AM, Bass NM, Davern TJ, Shakil AO, Han S, Harrison ME, Stravitz TR, Muñoz S, Brown R, Lee WM, Blei AT. Complications and use of intracranial pressure monitoring in patients with acute liver failure and severe encephalopathy. *Liver Transplant*. 2005;11(12):1581–9.
88. Rosenberg JB, Shiloh AL, Savel RH, Eisen LA. Non-invasive methods of estimating intracranial pressure. *Neurocrit Care*. 2011;15(3):599–608.
89. Bigelow WG, Lindsay WK. Oxygen transport and utilization in dogs at low body temperatures. *Am J Physiol*. 1950;160(1):125–37.

9. BIBLIOGRAFÍA

90. Jalan R, O Damink SW, Deutz NE, Lee A, Hayes PC. Moderate hypothermia for uncontrolled intracranial hypertension in acute liver failure. *Lancet* (London, England). 1999;354(9185):1164–8.
91. Stravitz RT, Larsen FS. Therapeutic hypothermia for acute liver failure. *Crit Care Med*. 2009;37(7 Suppl):S258–64.
92. Khan H, Belsher J, Yilmaz M, Afessa B, Winters JL, Moore SB, Hubmayr RD, Gajic O. Fresh-frozen plasma and platelet transfusions are associated with development of acute lung injury in critically ill medical patients. *Chest*. 2007;131(5):1308–14.
93. Sarani B, Dunkman WJ, Dean L, Sonnad S, Rohrbach JI, Gracias VH. Transfusion of fresh frozen plasma in critically ill surgical patients is associated with an increased risk of infection. *Crit Care Med*. 2008;36(4):1114–8.
94. Shami VM, Caldwell SH, Hespenheide EE, Arseneau KO, Bickston SJ, Macik BG. Recombinant activated factor VII for coagulopathy in fulminant hepatic failure compared with conventional therapy. *Liver Transpl*. 2003;9(2):138–43.
95. Kodakat S, Gopal P, Wendon J. Hyperglycemia is associated with intracranial hypertension in patients with acute liver failure. *Liver Transplant*. 2001;7(Suppl)(C-21).
96. Als-Nielsen B, Koretz RL, Kjaergard LL, Gluud C. Branched-chain amino acids for hepatic encephalopathy. *Cochrane database Syst Rev*. 2003;(2):CD001939.
97. Montejo González JC, Mesejo A, Bonet Saris A. Guidelines for specialized nutritional and metabolic support in the critically-ill patient. Update. Consensus of the Spanish Society of Intensive Care Medicine and Coronary Units-Spanish Society of Parenteral and Enteral Nutrition (SEMICYUC-SENPE): liver. *Med Intensiva*. 2011;35 Suppl 1:28–32.
98. Vaquero J. Therapeutic hypothermia in the management of acute liver failure. *Neurochem Int*. 2012;60(7):723–35.
99. NCT00518440-A Multi-Center Trial to Study Acute Liver Failure in Adults. www.clinicaltrials.gov.
100. NCT02460510-Role of Hypertonic Saline Versus Mannitol in the Management of Raised Intracranial Pressure in Patients With ALF: A Randomized Open -Label Study. www.clinicaltrials.gov.
101. NCT01548690-A Phase 2a Study to Evaluate the Safety and Tolerability of OCR-002 (Ornithine Phenylacetate) in the Treatment of Patients With Acute Liver Failure. www.clinicaltrials.gov.
102. NCT02552901-A Pivotal, Within Subject, Comparison of the LFT™ Dye Monitor System to the Indocyanine Green Dye (ICG) Serial Blood Plasma Disappearance Rate in Patients With Impaired and Non-Impaired Hepatic Function. www.clinicaltrials.gov.
103. NCT02310542-Comparison of Two Extracorporeal Liver Support System

9. BIBLIOGRAFÍA

- (With or Without Recirculation): MARS (Molecular Adsorbents Recirculating System) Versus SPAD (Single Pass Albumin Dialysis) in Severe Liver Failure. www.clinicaltrials.gov.
104. Saliba F, Samuel D. Artificial liver support: a real step forward. *Minerva Med.* 2015;106(1):35–43.
 105. Heemann U. Albumin dialysis in cirrhosis with superimposed acute liver injury: A prospective, controlled study. *Hepatology.* 2002;36(4):949–58.
 106. Mitzner SR, Stange J, Klammt S, Risler T, Erley CM, Bader BD, Berger ED, Lauchart W, Peszynski P, Freytag J, Hickstein H, Looock J, Löhr J-M, Liebe S, Emmrich J, Korten G, Schmidt R. Improvement of hepatorenal syndrome with extracorporeal albumin dialysis mars: Results of a prospective, randomized, controlled clinical trial. *Liver Transplant.* 2003;6(3):277–86.
 107. Schmidt LE, Wang LP, Hansen BA, Larsen FS. Systemic hemodynamic effects of treatment with the molecular adsorbents recirculating system in patients with hyperacute liver failure: a prospective controlled trial. *Liver Transpl.* 2003;9(3):290–7.
 108. Sen S, Davies NA, Mookerjee RP, Cheshire LM, Hodges SJ, Williams R, Jalan R. Pathophysiological effects of albumin dialysis in acute-on-chronic liver failure: a randomized controlled study. *Liver Transpl.* 2004;10(9):1109–19.
 109. El Banayosy A, Kizner L, Schueler V, Bergmeier S, Cobaugh D, Koerfer R. First use of the Molecular Adsorbent Recirculating System technique on patients with hypoxic liver failure after cardiogenic shock. *ASAIO J.* 50(4):332–7.
 110. Hassanein TI, Tofteng F, Brown RS, McGuire B, Lynch P, Mehta R, Larsen FS, Gornbein J, Stange J, Blei AT. Randomized controlled study of extracorporeal albumin dialysis for hepatic encephalopathy in advanced cirrhosis. *Hepatology.* 2007;46(6):1853–62.
 111. Montejo González JC, Catalán González M, Meneu Díaz JC, Moreno Elola-Olaso A, De la Cruz J, Moreno González E. Artificial liver support system in acute liver failure patients waiting liver transplantation. *Hepatology.* 56(90):456–61.
 112. Liu JP, Gluud LL, Als-Nielsen B, Gluud C. Artificial and bioartificial support systems for liver failure. *Cochrane database Syst Rev.* 2004;(1):CD003628.
 113. Vaid A, Chweich H, Balk EM, Jaber BL. Molecular adsorbent recirculating system as artificial support therapy for liver failure: a meta-analysis. *ASAIO J.* 58(1):51–9.
 114. Saliba F, Camus C, Durand F, Mathurin P, Letierce A, Delafosse B, Barange K, Perrigault PF, Belnard M, Ichaï P, Samuel D. Albumin dialysis with a noncell artificial liver support device in patients with acute liver failure: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* 2013;159(8):522–31.
 115. Stutchfield BM, Simpson K, Wigmore SJ. Systematic review and meta-analysis of survival following extracorporeal liver support. *Br J Surg.* 2011;98(5):623–31.
 116. Demetriou AA, Brown RS, Busuttil RW, Fair J, McGuire BM, Rosenthal P, Am

9. BIBLIOGRAFÍA

- Esch JS, Lerut J, Nyberg SL, Salizzoni M, Fagan EA, de Hemptinne B, Broelsch CE, Muraca M, Salmeron JM, Rabkin JM, Metselaar HJ, Pratt D, De La Mata M, McChesney LP, Everson GT, Lavin PT, Stevens AC, Pitkin Z, Solomon BA. Prospective, randomized, multicenter, controlled trial of a bioartificial liver in treating acute liver failure. *Ann Surg.* 2004;239(5):660–7; discussion 667–70.
117. Falkenhagen D, Strobl W, Vogt G, Schrefl A, Linsberger I, Gerner FJ, Schoenhofen M. Fractionated plasma separation and adsorption system: a novel system for blood purification to remove albumin bound substances. *Artif Organs.* 1999;23(1):81–6.
118. Tsipotis E, Shuja A, Jaber BL. Albumin Dialysis for Liver Failure: A Systematic Review. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2015;22(5):382–90.
119. Laleman W, Wilmer A, Evenepoel P, Elst I Vander, Zeegers M, Zaman Z, Verslype C, Fevery J, Nevens F. Effect of the molecular adsorbent recirculating system and Prometheus devices on systemic haemodynamics and vasoactive agents in patients with acute-on-chronic alcoholic liver failure. *Crit Care.* 2006;10(4):R108.
120. Peszynski P, Klammt S, Peters E, Mitzner S, Stange J, Schmidt R. Albumin dialysis: single pass vs. recirculation (MARS). *Liver.* 2002;22 Suppl 2:40–2.
121. Krisper P, Haditsch B, Stauber R, Jung A, Stadlbauer V, Trauner M, Holzer H, Schneditz D. In vivo quantification of liver dialysis: Comparison of albumin dialysis and fractionated plasma separation. *J Hepatol.* 2005;43(3):451–7.
122. Evenepoel P, Laleman W, Wilmer A, Claes K, Kuypers D, Bammens B, Nevens F, Vanrenterghem Y. Prometheus Versus Molecular Adsorbents Recirculating System: Comparison of Efficiency in Two Different Liver Detoxification Devices. *Artif Organs.* 2006;30(4):276–84.
123. Stadlbauer V, Krisper P, Aigner R, Haditsch B, Jung A, Lackner C, Stauber RE. Effect of extracorporeal liver support by MARS and Prometheus on serum cytokines in acute-on-chronic liver failure. *Crit Care.* 2006;10(6):R169.
124. Faenza S, Baraldi O, Bernardi M, Bolondi L, Coli L, Cucchetti A, Donati G, Gozzetti F, Lauro A, Mancini E, Pinna AD, Piscaglia F, Rasciti L, Ravaioli M, Ruggeri G, Santoro A, Stefoni S. MARS and Prometheus: Our Clinical Experience in Acute Chronic Liver Failure. *Transplant Proc.* 2008;40(4):1169–71.
125. Dethloff T, Tofteng F, Frederiksen H-J, Hojskov M, Hansen B-A, Larsen F-S. Effect of Prometheus liver assist system on systemic hemodynamics in patients with cirrhosis: a randomized controlled study. *World J Gastroenterol.* 2008;14(13):2065–71.
126. Bañares R, Nevens F, Larsen FS, Jalan R, Albillos A, Dollinger M, Saliba F, Sauerbruch T, Klammt S, Ockenga J, Pares A, Wendon J, Brünner T, Kramer L, Mathurin P, de la Mata M, Gasbarrini A, Müllhaupt B, Wilmer A, Laleman W, Eefsen M, Sen S, Zipprich A, Tenorio T, Pavesi M, Schmidt HH-J, Mitzner S, Williams R, Arroyo V. Extracorporeal albumin dialysis with the molecular adsorbent recirculating system in acute-on-chronic liver failure: the RELIEF

9. BIBLIOGRAFÍA

- trial. *Hepatology*. 2013;57(3):1153–62.
127. Hughes RD, Pucknell A, Routley D, Langley PG, Wendon JA, Williams R. Evaluation of the BioLogic-DT sorbent-suspension dialyser in patients with fulminant hepatic failure. *Int J Artif Organs*. 1994;17(12):657–62.
 128. Zhou N, Li J, Zhang Y, Lu J, Chen E, Du W, Wang J, Pan X, Zhu D, Yang Y, Chen Y, Cao H, Li L. Efficacy of coupled low-volume plasma exchange with plasma filtration adsorption in treating pigs with acute liver failure: A randomised study. *J Hepatol*. 2015;63(2):378–87.
 129. Chamuleau RA. Future of bioartificial liver support. *World J Gastrointest Surg*. 2009;1(1):21–5.
 130. Puri P, Anand A. Association of Physicians of India. Medicine Update 2012: Liver Support Devices (p. 489-93).
 131. Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, Chapman LE, Lockey C, Onions D, Otto E. Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group. *Science*. 1999;285(5431):1236–41.
 132. Pitkin Z, Mullon C. Evidence of absence of porcine endogenous retrovirus (PERV) infection in patients treated with a bioartificial liver support system. *Artif Organs*. 1999;23(9):829–33.
 133. Nevens F, Laleman W. Artificial liver support devices as treatment option for liver failure. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2012;26(1):17–26.
 134. Faybik P, Krenn C-G. Extracorporeal liver support. *Curr Opin Crit Care*. 2013;19(2):149–53.
 135. Sen S, Williams R. New liver support devices in acute liver failure: a critical evaluation. *Semin Liver Dis*. 2003;23(3):283–94.
 136. Glorioso JM, Mao SA, Rodysill B, Mounajjed T, Kremers WK, Elgilani F, Hickey RD, Haugaa H, Rose CF, Amiot B, Nyberg SL. Pivotal preclinical trial of the spheroid reservoir bioartificial liver. *J Hepatol*. 2015;63(2):388–98.
 137. Landry J, Bernier D, Ouellet C, Goyette R, Marceau N. Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *J Cell Biol*. 1985;101(3):914–23.
 138. Nyberg SL, Hardin J, Amiot B, Argikar UA, Remmel RP, Rinaldo P. Rapid, large-scale formation of porcine hepatocyte spheroids in a novel spheroid reservoir bioartificial liver. *Liver Transpl*. 2005;11(8):901–10.
 139. Jaeck D, Boudjema K, Audet M, Chenard-Neu M-P, Simeoni U, Meyer C, Nakano H, Wolf P. Auxiliary partial orthotopic liver transplantation (APOLT) in the treatment of acute liver failure. *J Gastroenterol*. 2002;37 Suppl 1:88–91.
 140. Kasahara M, Takada Y, Egawa H, Fujimoto Y, Ogura Y, Ogawa K, Kozaki K, Haga H, Ueda M, Tanaka K. Auxiliary partial orthotopic living donor liver transplantation: Kyoto University experience. *Am J Transplant*.

- 2005;5(3):558–65.
141. Bismuth H, Azoulay D, Samuel D, Reynes M, Grimon G, Majno P, Castaing D. Auxiliary partial orthotopic liver transplantation for fulminant hepatitis. The Paul Brousse experience. *Ann Surg.* 1996;224(6):712–24; discussion 724–6.
 142. Chenard-Neu MP, Boudjema K, Bernuau J, Degott C, Belghiti J, Cherqui D, Costes V, Domergue J, Durand F, Erhard J, De Hemptinne B, Gubernatis G, Hadengue A, Kemnitz J, McCarthy M, Maschek H, Mentha G, Oldhafer K, Portmann B, Praet M, Ringers J, Rogiers X, Rubbia L, Schalm S, Bellocq JP. Auxiliary liver transplantation: regeneration of the native liver and outcome in 30 patients with fulminant hepatic failure--a multicenter European study. *Hepatology.* 1996;23(5):1119–27.
 143. Rajput I, Prasad KR, Bellamy MC, Davies M, Attia MS, Lodge JPA. Subtotal hepatectomy and whole graft auxiliary transplantation for acetaminophen-associated acute liver failure. *HPB (Oxford).* 2014;16(3):220–8.
 144. de la Rosa Rodríguez G. Registro Español de Trasplante Hepático. Organización Nacional de Trasplantes. Memoria de resultados. 2013.
 145. Bernal W, Cross TJS, Auzinger G, Sizer E, Heneghan MA, Bowles M, Muiesan P, Rela M, Heaton N, Wendon J, O'Grady JG. Outcome after wait-listing for emergency liver transplantation in acute liver failure: a single centre experience. *J Hepatol.* 2009;50(2):306–13.
 146. Castells A, Salmerón JM, Navasa M, Rimola A, Saló J, Andreu H, Mas A, Rodés J. Liver transplantation for acute liver failure: analysis of applicability. *Gastroenterology.* 1993;105(2):532–8.
 147. Tector AJ, Mangus RS, Chestovich P, Vianna R, Fridell JA, Milgrom ML, Sanders C, Kwo PY. Use of extended criteria livers decreases wait time for liver transplantation without adversely impacting posttransplant survival. *Ann Surg.* 2006;244(3):439–50.
 148. Brown RS, Russo MW, Lai M, Shiffman ML, Richardson MC, Everhart JE, Hoofnagle JH. A Survey of Liver Transplantation from Living Adult Donors in the United States. *N Engl J Med.* 2003;348(9):818–25.
 149. Mas A, Escorsell A, Fernández J. Liver transplantation for acute liver failure: a Spanish perspective. *Transplant Proc.* 2010;42(2):619–21.
 150. Polson J, Lee WM. Etiologies of acute liver failure: location, location, location! *Liver Transpl.* 2007;13(10):1362–3.
 151. Keays R, Harrison PM, Wendon JA, Forbes A, Gove C, Alexander GJ, Williams R. Intravenous acetylcysteine in paracetamol induced fulminant hepatic failure: a prospective controlled trial. *BMJ.* 1991;303(6809):1026–9.
 152. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145–7.
 153. Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

9. BIBLIOGRAFÍA

- 1998;95(23):13726–31.
154. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970;3(4):393–403.
 155. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13(12):4279–95.
 156. Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg.* 2002;109(1):199–209; discussion 210–1.
 157. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic Potential of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells in Vitro and in Vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290(2):763–9.
 158. Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T, Takase B, Ishizuka T, Kikuchi M, Fujikawa K, Ishihara M. Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs.* 2004;178(1):2–12.
 159. Safford KM, Safford SD, Gimble JM, Shetty AK, Rice HE. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp Neurol.* 2004;187(2):319–28.
 160. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, Müller B, Zulewski H. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;341(4):1135–40.
 161. Rangappa S, Entwistle JWC, Wechsler AS, Kresh JY. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;126(1):124–32.
 162. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine R V, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation.* 2004;109(10):1292–8.
 163. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;328(1):258–64.
 164. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315–7.
 165. Kundrotas G. Surface markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Acta medica Litu.* 2012;19(2):75–9.
 166. Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, Nelson M, Patil S, Hardy W, Sturgeon C, Hewett T, Chung T, Stock W, Sher D, Weissman S, Ferrer K, Mosca J, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells are capable

- of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol*. 2001;29(2):244–55.
167. Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*. 2004;104(9):2643–5.
 168. Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, Demarquay C, Cuvelier F, Mathieu E, Trompier F, Dudoignon N, Germain C, Mazurier C, Aigueperse J, Borneman J, Gorin NC, Gourmelon P, Thierry D. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med*. 2003;5(12):1028–38.
 169. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Morando L, Mauriello-Romanazzi G, Sanavio F, Stamenkovic I, Biancone L, Camussi G. Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. *Kidney Int*. 2007;72(4):430–41.
 170. Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery*. 2003;53(3):697–702; discussion 702–3.
 171. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(18):10344–9.
 172. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(14):8407–11.
 173. Gnecci M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008;103(11):1204–19.
 174. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*. 2007;25(11):2896–902.
 175. Tögel FE, Westenfelder C. Mesenchymal stem cells: a new therapeutic tool for AKI. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6(3):179–83.
 176. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*. 2002;297(5590):2256–9.
 177. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 2003;5(6):485–9.
 178. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*.

- 2005;129(1):118–29.
179. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* 2006;36(10):2566–73.
 180. Chen X, Armstrong MA, Li G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. *Immunol Cell Biol.* 2006;84(5):413–21.
 181. Riordan NH, Ichim TE, Min W-P, Wang H, Solano F, Lara F, Alfaro M, Rodriguez JP, Harman RJ, Patel AN, Murphy MP, Lee RR, Minev B. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J Transl Med.* 2009;7:29.
 182. de la Portilla F, Alba F, García-Olmo D, Herrerías JM, González FX, Galindo A. Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn's disease: results from a multicenter phase I/IIa clinical trial. *Int J Colorectal Dis.* 2013;28(3):313–23.
 183. Gonzalez-Rey E, Gonzalez MA, Varela N, O'Valle F, Hernandez-Cortes P, Rico L, Büscher D, Delgado M. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(1):241–8.
 184. Toubai T, Paczesny S, Shono Y, Tanaka J, Lowler KP, Malter CT, Kasai M, Imamura M. Mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2009;4(4):252–9.
 185. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, Laine GA, Cox CS. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev.* 2009;18(5):683–92.
 186. Loi R, Beckett T, Goncz KK, Suratt BT, Weiss DJ. Limited restoration of cystic fibrosis lung epithelium in vivo with adult bone marrow-derived cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(2):171–9.
 187. Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, Abbate M, Rottoli D, Angioletti S, Benigni A, Perico N, Alison M, Remuzzi G. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(7):1794–804.
 188. Tögel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P, Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(5):F1626–35.
 189. Chen Y-T, Yang C-C, Zhen Y-Y, Wallace C, Yang J-L, Sun C-K, Tsai T-H, Sheu J-J, Chua S, Chang C-L, Cho C-L, Leu S, Yip H-K. Cyclosporine-assisted adipose-derived mesenchymal stem cell therapy to mitigate acute kidney ischemia-reperfusion injury. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(3):62.
 190. Li J, Zhang L, Xin J, Jiang L, Zhang T, Jin L, Li J, Zhou P, Hao S, Cao H, Li L. Immediate intraportal transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells prevents death from fulminant hepatic failure in

- pigs. *Hepatology*. 2012;56(3):1044–52.
191. Zhang S, Chen L, Liu T, Zhang B, Xiang D, Wang Z, Wang Y. Human umbilical cord matrix stem cells efficiently rescue acute liver failure through paracrine effects rather than hepatic differentiation. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(13-14):1352–64.
 192. NCT01429038-Infusion of Third-party Mesenchymal Stem Cells After Renal or Liver Transplantation. A Phase I-II, Open-label, Clinical Study. www.clinicaltrials.gov.
 193. Biancone L, Bruno S, Deregibus MC, Tetta C, Camussi G. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(8):3037–42.
 194. Bruno S, Bussolati B. Therapeutic effects of mesenchymal stem cells on renal ischemia-reperfusion injury: a matter of genetic transfer? *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):55.
 195. Bruno S, Grange C, Collino F, Deregibus MC, Cantaluppi V, Biancone L, Tetta C, Camussi G. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury. *PLoS One*. 2012;7(3):e33115.
 196. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Calogero RA, Saviozzi S, Collino F, Morando L, Busca A, Falda M, Bussolati B, Tetta C, Camussi G. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(5):1053–67.
 197. Lee C, Mitsialis SA, Aslam M, Vitali SH, Vergadi E, Konstantinou G, Sdrimas K, Fernandez-Gonzalez A, Kourembanas S. Exosomes Mediate the Cytoprotective Action of Mesenchymal Stromal Cells on Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Circulation*. 2012;126(22):2601–11.
 198. Zhu Y-G, Feng X-M, Abbott J, Fang X-H, Hao Q, Monsel A, Qu J-M, Matthay MA, Lee JW. Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of *Escherichia coli* endotoxin-induced acute lung injury in mice. *Stem Cells*. 2014;32(1):116–25.
 199. Monsel A, Zhu Y, Gennai S, Hao Q, Liu J, Lee JW. Cell-based Therapy for Acute Organ Injury. *Anesthesiology*. 2014;121(5):1099–121.
 200. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211–28.
 201. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294–301.
 202. Di Rocco G, Iachininoto MG, Tritarelli A, Straino S, Zacheo A, Germani A, Crea F, Capogrossi MC. Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 14):2945–52.
 203. Planat-Bénard V, Menard C, André M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo J-M, Pénicaud L, Casteilla L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from

9. BIBLIOGRAFÍA

- adipose tissue stroma cells. *Circ Res*. 2004;94(2):223–9.
204. Brzoska M, Geiger H, Gauer S, Baer P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;330(1):142–50.
 205. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003;174(3):101–9.
 206. Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell*. 2010;21(11):1783–7.
 207. García-Olmo D, García-Olmo DC. Stem cells: promises and realities in cancer research. *Clin Transl Oncol*. 2006;8(5):301–2.
 208. Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula including Crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther*. 2008;8(9):1417–23.
 209. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual M, Pascual I, De-La-Quintana P, Trebol J, Garcia-Arranz M. Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's Disease with adipose-derived stem cells: a comparison of protocols with and without cell expansion. *Int J Colorectal Dis*. 2008;24(1):27–30.
 210. Vilalta M, Dégano IR, Bagó J, Gould D, Santos M, García-Arranz M, Ayats R, Fuster C, Chernajovsky Y, García-Olmo D, Rubio N, Blanco J. Biodistribution, long-term survival, and safety of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells transplanted in nude mice by high sensitivity non-invasive bioluminescence imaging. *Stem Cells Dev*. 2008;17(5):993–1003.
 211. Taxonera C, Schwartz DA, García-Olmo D. Emerging treatments for complex perianal fistula in Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2009;15(34):4263–72.
 212. García-Arranz M, Gómez-Pinedo U, Hardisson D, Herreros D, Guadalajara H, García-Gómez I, García-Verdugo JM, García-Olmo D. Histopathological analysis of human specimens removed from the injection area of expanded adipose-derived stem cells. *Histopathology*. 2010;56(7):979–82.
 213. García-Gómez I, Elvira G, Zapata AG, Lamana ML, Ramírez M, Castro JG, Arranz MG, Vicente A, Bueren J, García-Olmo D. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther*. 2010;10(10):1453–68.
 214. García-Olmo D, García-Arranz M. [Cells for curing. From the heart to everything]. *An Pediatr (Barc)*. 2011;74(4):215–7.
 215. Trebol Lopez J, Georgiev Hristov T, García-Arranz M, García-Olmo D. Stem cell therapy for digestive tract diseases: current state and future perspectives. *Stem Cells Dev*. 2011;20(7):1113–29.
 216. Guadalajara H, Herreros D, De-La-Quintana P, Trebol J, Garcia-Arranz M, Garcia-Olmo D. Long-term follow-up of patients undergoing adipose-derived adult stem cell administration to treat complex perianal fistulas. *Int J*

9. BIBLIOGRAFÍA

- Colorectal Dis. 2012;27(5):595–600.
217. Garcia-Olmo D, Guadalajara H, Rubio-Perez I, Herreros MD, De-la-Quintana P, Garcia-Arranz M. Recurrent anal fistulae: limited surgery supported by stem cells. *World J Gastroenterol*. 2015;21(11):3330–6.
 218. Sanz-Baro R, García-Arranz M, Guadalajara H, de la Quintana P, Herreros MD, García-Olmo D. First-in-Human Case Study: Pregnancy in Women With Crohn's Perianal Fistula Treated With Adipose-Derived Stem Cells: A Safety Study. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(6):598–602.
 219. Herreros MD, Garcia-Arranz M, Guadalajara H, De-La-Quintana P, Garcia-Olmo D. Autologous expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex cryptoglandular perianal fistulas: a phase III randomized clinical trial (FATT 1: fistula Advanced Therapy Trial 1) and long-term evaluation. *Dis Colon Rectum*. 2012;55(7):762–72.
 220. Pountos I, Giannoudis P V. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury*. 2005;36 Suppl 3:S8–12.
 221. Alison MR, Poulsom R, Forbes SJ. Update on hepatic stem cells. *Liver*. 2001;21(6):367–73.
 222. Howard RB, Christensen AK, Gibbs FA, Pesch LA. The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. *J Cell Biol*. 1967;35(3):675–84.
 223. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol*. 1969;43(3):506–20.
 224. Matas AJ, Sutherland DE, Steffes MW, Mauer SM, Sowe A, Simmons RL, Najarian JS. Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasms bilirubin in Gunn rats. *Science*. 1976;192(4242):892–4.
 225. Sutherland DE, Numata M, Matas AJ, Simmons RL, Najarian JS. Hepatocellular transplantation in acute liver failure. *Surgery*. 1977;82(1):124–32.
 226. Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, Inoue Y, Sakaguchi M, Noguchi H, Miyazaki M, Cai J, Tanaka N, Fox IJ, Leboulch P. Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science*. 2000;287(5456):1258–62.
 227. Mito M, Kusano M, Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc*. 1992;24(6):3052–3.
 228. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter B V, Strom SC. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1998;338(20):1422–6.
 229. Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation*. 2006;82(4):441–9.
 230. Pareja E, Cortés M, Gómez-Lechón MJ, Maupoey J, San Juan F, López R, Mir J. Current status and future perspectives of hepatocyte transplantation. *Cirugía española*. 2014;92(2):74–81.

9. BIBLIOGRAFÍA

231. Bartlett DC, Newsome PN. Hepatocyte cell therapy in liver disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;1–12.
232. Sgroi A, Mai G, Morel P, Baertschiger RM, Gonelle-Gispert C, Serre-Beinier V, Buhler LH. Transplantation of encapsulated hepatocytes during acute liver failure improves survival without stimulating native liver regeneration. *Cell Transplant*. 2011;20(11-12):1791–803.
233. Terry C, Dhawan A, Mitry RR, Lehec SC, Hughes RD. Optimization of the cryopreservation and thawing protocol for human hepatocytes for use in cell transplantation. *Liver Transplant*. 2010;16(2):229–37.
234. Pless G, Sauer IM, Rauen U. Improvement of the cold storage of isolated human hepatocytes. *Cell Transplant*. 2012;21(1):23–37.
235. Terry C, Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: State of the art. *Cryobiology*. 2006;53(2):149–59.
236. Forbes SJ, Gupta S, Dhawan A. Cell therapy for liver disease: From liver transplantation to cell factory. *J Hepatol*. 2015;62(1 Suppl):S157–69.
237. Yamanouchi K, Zhou H, Roy-Chowdhury N, Macaluso F, Liu L, Yamamoto T, Yannam GR, Enke C, Solberg TD, Adelson AB, Platt JL, Fox IJ, Roy-Chowdhury J, Guha C. Hepatic irradiation augments engraftment of donor cells following hepatocyte transplantation. *Hepatology*. 2009;49(1):258–67.
238. Krause P, Wolff HA, Rave-Frank M, Schmidberger H, Becker H, Hess CF, Christiansen H, Koenig S. Fractionated external beam radiotherapy as a suitable preparative regimen for hepatocyte transplantation after partial hepatectomy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011;80(4):1214–9.
239. Dagher I, Nguyen TH, Groyer-Picard M-T, Lainas P, Mainot S, Guettier C, Pariente D, Franco D, Weber A. Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates. *Hepatology*. 2009;49(3):950–9.
240. NCT01345565-Hepatocyte Transplantation for Acute Decompensated Liver Failure. www.clinicaltrials.gov.
241. Weber A, Touboul T, Mainot S, Branger J, Mahieu-Caputo D. Hepatocytes. Maurel P, editor. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). Totowa, NJ: Humana Press; 2010. 41-55 p.
242. Khan AA, Habeeb A, Parveen N, Naseem B, Babu RP, Capoor AK, Habibullah CM. Peritoneal transplantation of human fetal hepatocytes for the treatment of acute fatty liver of pregnancy: a case report. *Trop Gastroenterol*. 25(3):141–3.
243. Habibullah CM, Syed IH, Qamar A, Taher-Uz Z. Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation*. 1994;58(8):951–2.
244. Gridelli B, Vizzini G, Pietrosi G, Luca A, Spada M, Gruttadauria S, Cintorino D, Amico G, Chinnici C, Miki T, Schmelzer E, Conaldi PG, Triolo F, Gerlach JC. Efficient human fetal liver cell isolation protocol based on vascular perfusion

- for liver cell-based therapy and case report on cell transplantation. *Liver Transpl.* 2012;18(2):226–37.
245. Nierhoff D, Ogawa A, Oertel M, Chen Y-Q, Shafritz DA. Purification and characterization of mouse fetal liver epithelial cells with high in vivo repopulation capacity. *Hepatology.* 2005;42(1):130–9.
246. Oertel M, Menthena A, Dabeva MD, Shafritz DA. Cell Competition Leads to a High Level of Normal Liver Reconstitution by Transplanted Fetal Liver Stem/Progenitor Cells. *Gastroenterology.* 2006;130(2):507–20.
247. Haridass D, Yuan Q, Becker PD, Cantz T, Iken M, Rothe M, Narain N, Bock M, Nörder M, Legrand N, Wedemeyer H, Weijer K, Spits H, Manns MP, Cai J, Deng H, Di Santo JP, Guzman CA, Ott M. Repopulation efficiencies of adult hepatocytes, fetal liver progenitor cells, and embryonic stem cell-derived hepatic cells in albumin-promoter-enhancer urokinase-type plasminogen activator mice. *Am J Pathol.* 2009;175(4):1483–92.
248. Farber E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* 1956;16(2):142–8.
249. Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, Wauthier E, Ludlow J, Yao H, Moss N, Melhem A, McClelland R, Turner W, Kulik M, Sherwood S, Tallheden T, Cheng N, Furth ME, Reid LM. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med.* 2007;204(8):1973–87.
250. Itoh T, Miyajima A. Liver regeneration by stem/progenitor cells. *Hepatology.* 2014;59(4):1617–26.
251. Best J, Dollé L, Manka P, Coombes J, van Grunsven LA, Syn W-K. Role of liver progenitors in acute liver injury. *Front Physiol.* 2013;4:258.
252. Tarlow BD, Pelz C, Naugler WE, Wakefield L, Wilson EM, Finegold MJ, Grompe M. Bipotential Adult Liver Progenitors Are Derived from Chronically Injured Mature Hepatocytes. *Cell Stem Cell.* 2014;15(5):605–18.
253. Yanger K, Knigin D, Zong Y, Maggs L, Gu G, Akiyama H, Pikarsky E, Stanger BZ. Adult Hepatocytes Are Generated by Self-Duplication Rather than Stem Cell Differentiation. *Cell Stem Cell.* 2014;15(3):340–9.
254. Theise ND, Dollé L, Kuwahara R. Low Hepatocyte Repopulation From Stem Cells: A Matter of Hepatobiliary Linkage Not Massive Production. *Gastroenterology.* 2013;145(1):253–4.
255. Feldmann G. Liver transplantation of hepatic stem cells: potential use for treating liver diseases. *Cell Biol Toxicol.* 2001;17(2):77–85.
256. Zaret KS, Grompe M. Generation and Regeneration of Cells of the Liver and Pancreas. *Science.* 2008;322(5907):1490–4.
257. Marieb E, Hoehn K. *Human Anatomy & Physiology.* 9th ed. Pearson; 2012. 1264 p.
258. Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Löönnies H, Marschall H-U, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt

9. BIBLIOGRAFÍA

- L, Le Blanc K. Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Therapy-Resistant Graft-versus-Host Disease. *Transplantation*. 2006;81(10):1390–7.
259. El-Badri NS, Maheshwari A, Sanberg PR. Mesenchymal stem cells in autoimmune disease. *Stem Cells Dev*. 2004;13(5):463–72.
260. Minguell JJ, Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006;231(1):39–49.
261. Margini C, Vukotic R, Brodosi L, Bernardi M, Andreone P. Bone marrow derived stem cells for the treatment of end-stage liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(27):9098–105.
262. Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Bagheri M, Ashrafi M, Abdollahzadeh L, Akhlaghpour S, Bashtar M, Ghavamzadeh A, Malekzadeh R. Randomized placebo-controlled trial of mesenchymal stem cell transplantation in decompensated cirrhosis. *Liver Int*. 2013;33(10):1490–6.
263. Gasbarrini A, Rapaccini GL, Rutella S, Zocco MA, Tittoto P, Leone G, Pola P, Gasbarrini G, Di Campli C. Rescue therapy by portal infusion of autologous stem cells in a case of drug-induced hepatitis. *Dig Liver Dis*. 2007;39(9):878–82.
264. Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology*. 2004;39(6):1477–87.
265. Peng L, Xie D, Lin B-L, Liu J, Zhu H, Xie C, Zheng Y, Gao Z. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes. *Hepatology*. 2011;54(3):820–8.
266. Esrefoglu M. Role of stem cells in repair of liver injury: experimental and clinical benefit of transferred stem cells on liver failure. *World J Gastroenterol*. 2013;19(40):6757–73.
267. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997;385(6619):810–3.
268. Cowan CA. Nuclear Reprogramming of Somatic Cells After Fusion with Human Embryonic Stem Cells. *Science (80-)*. 2005;309(5739):1369–73.
269. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663–76.
270. Sauer V, Roy-Chowdhury N, Guha C, Roy-Chowdhury J. Induced Pluripotent Stem Cells as a Source of Hepatocytes. *Curr Pathobiol Rep*. 2014;2(1):11–20.
271. Liu H, Ye Z, Kim Y, Sharkis S, Jang Y-Y. Generation of endoderm-derived human induced pluripotent stem cells from primary hepatocytes. *Hepatology*. 2010;51(5):1810–9.
272. Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, Wilson KD, Lee A, Jia F, Hu S, Cherry AM, Robbins RC, Longaker MT, Wu JC. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A. 2009;106(37):15720–5.
273. Moslem M, Valojerdi MR, Pournasr B, Muhammadnejad A, Baharvand H. Therapeutic Potential of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells in Mice With Lethal Fulminant Hepatic Failure. *Cell Transplant*. 2013;22(10):1785–99.
 274. Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C, North PE, Dalton S, Duncan SA. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology*. 2010;51(1):297–305.
 275. Schwartz RE, Fleming HE, Khetani SR, Bhatia SN. Pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Biotechnol Adv*. 32(2):504–13.
 276. Han S, Bourdon A, Hamou W, Dziedzic N, Goldman O, Gouon-Evans V. Generation of functional hepatic cells from pluripotent stem cells. *J Stem Cell Res Ther*. 2012;Suppl 10(8):1–7.
 277. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154–6.
 278. Laslett AL, Filipczyk AA, Pera MF. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13(7):295–301.
 279. Baxter M, Withey S, Harrison S, Segeritz C-P, Zhang F, Atkinson-Dell R, Rowe C, Gerrard DT, Sison-Young R, Jenkins R, Henry J, Berry AA, Mohamet L, Best M, Fenwick SW, Malik H, Kitteringham NR, Goldring CE, Piper Hanley K, Vallier L, Hanley NA. Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *J Hepatol*. 2015;62(3):581–9.
 280. Reemtsma K. Renal heterotransplantation. *Adv Surg*. 1966;2:285–93.
 281. Dooldeniya MD, Warrens AN. Xenotransplantation: where are we today? *J R Soc Med*. 2003;96(3):111–7.
 282. Nagata H, Ito M, Cai J, Edge AS, Platt JL, Fox IJ. Treatment of cirrhosis and liver failure in rats by hepatocyte xenotransplantation. *Gastroenterology*. 2003;124(2):422–31.
 283. Meier RPH, Navarro-Alvarez N, Morel P, Schuurman H-J, Strom S, Bühler LH. Current status of hepatocyte xenotransplantation. *Int J Surg*. 2015;
 284. Mann F. Studies in the physiology of the liver: I. Technic and general effects of removal. *Am J Med Sci*. 1921;161(1):37–42.
 285. Filipponi F, Boggi U, Meacci L, Burchielli S, Vistoli F, Bellini R, Prota C, Colizzi L, Kusmic C, Campani D, Gneri C, Trivella MG, Mosca F. A new technique for total hepatectomy in the pig for testing liver support devices. *Surgery*. 1999;125(4):448–55.
 286. Sosef MN, van Gulik TM. Total hepatectomy model in pigs: revised method for vascular reconstruction using a rigid vascular prosthesis. *Eur Surg Res*. 36(1):8–12.
 287. Frühauf NR, Oldhafer KJ, Hölzje M, Kaiser GM, Frühauf J-H, Stavrou GA, Bader A, Broelsch CE. A bioartificial liver support system using primary

- hepatocytes: a preclinical study in a new porcine hepatectomy model. *Surgery*. 2004;136(1):47–56.
288. van de Kerkhove M-P, Hoekstra R, van Gulik TM, Chamuleau RAFM. Large animal models of fulminant hepatic failure in artificial and bioartificial liver support research. *Biomaterials*. 2004;25(9):1613–25.
289. Frank HA, Jacob SW. One-stage hepatectomy in the dog; preserving the inferior vena cava. *Am J Physiol*. 1952;168(1):156–8.
290. Knubben K, Thiel C, Schenk M, Etspüler A, Schenk T, Morgalla MH, Königsrainer A. A new surgical model for hepatectomy in pigs. *Eur Surg Res*. 2008;40(1):41–6.
291. Starzl TE, Bernhard VM, Benvenuto R, Cortes N. A new method for one-stage hepatectomy for dogs. *Surgery*. 1959;46:880–6.
292. Azoulay D, Astarcioglu I, Astarcioglu H, Lemoine A, Majno P, Bismuth H. A new technique of one-stage total hepatectomy in the rat. *Surgery*. 1997;121(2):219–22.
293. Daloze P, Des Rosiers C, Arnoux R, Daloze T, Smeesters C, Brunengraber H. One-stage hepatectomy in the dog. *J Surg Res*. 1990;48(1):33–7.
294. Lempinen M, Soyer T, Eiseman B. A new technique for preparing totally hepatectomized pigs. *Surgery*. 1973;73(3):463–7.
295. Bélanger M, Butterworth RF. Acute liver failure: a critical appraisal of available animal models. *Metab Brain Dis*. 2005;20(4):409–23.
296. Gaub J, Iversen J. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. *Hepatology*. 4(5):902–4.
297. Karrer FM, Rhenman B, Buckley AR, Steinbronn KK, Putnam CW. A reproducible large animal model of acute hepatic failure. *Curr Surg*. 41(6):464–7.
298. Palmes D, Spiegel H-U. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials*. 2004;25(9):1601–11.
299. Gao Y, Mu N, Xu X-P, Wang Y. Porcine acute liver failure model established by two-phase surgery and treated with hollow fiber bioartificial liver support system. *World J Gastroenterol*. 2005;11(35):5468–74.
300. Sen S, Rose C, Ytrebø LM, Davies NA, Nedredal GI, Drevland SS, Kjønnø M, Prinzen FW, Hodges SJ, Deutz NEP, Williams R, Butterworth RF, Revhaug A, Jalan R. Effect of albumin dialysis on intracranial pressure increase in pigs with acute liver failure: a randomized study. *Crit Care Med*. 2006;34(1):158–64.
301. Rozga J, Williams F, Ro MS, Neuzil DF, Giorgio TD, Backfisch G, Moscioni AD, Hakim R, Demetriou AA. Development of a bioartificial liver: properties and function of a hollow-fiber module inoculated with liver cells. *Hepatology*. 1993;17(2):258–65.
302. Frühauf NR, Oldhafer KJ, Westermann S, Sotiropoulos GC, Kaiser GM. Acute hepatic failure in swine: hepatectomy versus vascular occlusion. *J Invest*

- Surg. 17(3):163–71.
303. de Groot GH, Reuvers CB, Schalm SW, Boks AL, Terpstra OT, Jeekel H, ten Kate FW, Bruinvels J. A reproducible model of acute hepatic failure by transient ischemia in the pig. *J Surg Res.* 1987;42(1):92–100.
 304. Fourneau I, Pirenne J, Roskams T, Yap SH. An improved model of acute liver failure based on transient ischemia of the liver. *Arch Surg.* 2000;135(10):1183–9.
 305. Benoist S, Sarkis R, Baudrimont M, Delelo R, Robert A, Vaubourdolle M, Ballardur P, Calmus Y, Capeau J, Nordlinger B. A reversible model of acute hepatic failure by temporary hepatic ischemia in the pig. *J Surg Res.* 2000;88(2):63–9.
 306. Gunawan BK, Liu Z-X, Han D, Hanawa N, Gaarde WA, Kaplowitz N. c-Jun N-terminal kinase plays a major role in murine acetaminophen hepatotoxicity. *Gastroenterology.* 2006;131(1):165–78.
 307. Hanawa N, Shinohara M, Saberi B, Gaarde WA, Han D, Kaplowitz N. Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. *J Biol Chem.* 2008;283(20):13565–77.
 308. Win S, Than TA, Han D, Petrovic LM, Kaplowitz N. c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent acute liver injury from acetaminophen or tumor necrosis factor (TNF) requires mitochondrial Sab protein expression in mice. *J Biol Chem.* 2011;286(40):35071–8.
 309. Jaeschke H, Xie Y, McGill MR. Acetaminophen-induced Liver Injury: from Animal Models to Humans. *J Clin Transl Hepatol.* 2014;2(3):153–61.
 310. Boyd EM, Bereczky GM. Liver necrosis from paracetamol. *Br J Pharmacol Chemother.* 1966;26(3):606–14.
 311. McGill MR, Lebofsky M, Norris H-RK, Slawson MH, Bajt ML, Xie Y, Williams CD, Wilkins DG, Rollins DE, Jaeschke H. Plasma and liver acetaminophen-protein adduct levels in mice after acetaminophen treatment: dose-response, mechanisms, and clinical implications. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;269(3):240–9.
 312. Miller DJ, Hickman R, Fratter R, Terblanche J, Saunders SJ. An animal model of fulminant hepatic failure: a feasibility study. *Gastroenterology.* 1976;71(1):109–13.
 313. Francavilla A, Makowka L, Polimeno L, Barone M, Demetris J, Prelich J, Van Thiel DH, Starzl TE. A dog model for acetaminophen-induced fulminant hepatic failure. *Gastroenterology.* 1989;96(2 Pt 1):470–8.
 314. Gazzard BG, Hughes RD, Mellon PJ, Portmann B, Williams R. A dog model of fulminant hepatic failure produced by paracetamol administration. *Br J Exp Pathol.* 1975;56(5):408–11.
 315. Kelly JH, Koussayer T, He DE, Chong MG, Shang TA, Whisennand HH, Sussman NL. An improved model of acetaminophen-induced fulminant hepatic failure in dogs. *Hepatology.* 1992;15(2):329–35.

9. BIBLIOGRAFÍA

316. Newsome PN, Henderson NC, Nelson LJ, Dabos C, Filippi C, Bellamy C, Howie F, Clutton RE, King T, Lee A, Hayes PC, Plevris JN. Development of an invasively monitored porcine model of acetaminophen-induced acute liver failure. *BMC Gastroenterol.* 2010;10:34.
317. Lee KCL, Palacios Jimenez C, Alibhai H, Chang Y-M, Leckie PJ, Baker LA, Stanzani G, L Priestnall S, Mookerjee RP, Jalan R, Davies NA. A reproducible, clinically relevant, intensively managed, pig model of acute liver failure for testing of therapies aimed to prolong survival. *Liver Int.* 2013;33(4):544–51.
318. Lee KCL, Baker LA, Stanzani G, Alibhai H, Chang YM, Jimenez Palacios C, Leckie PJ, Giordano P, Priestnall SL, Antoine DJ, Jenkins RE, Goldring CE, Park BK, Andreola F, Agarwal B, Mookerjee RP, Davies NA, Jalan R. Extracorporeal liver assist device to exchange albumin and remove endotoxin in acute liver failure: Results of a pivotal pre-clinical study. *J Hepatol.* 2015;63(3):634–42.
319. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Re-evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide. Volume 71. Pages: 401-432. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. 1999.
320. Rahman TM, Hodgson HJ. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol.* 2000;81(2):145–57.
321. Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci.* 1991;36(6):770–4.
322. Klaassen CD, Plaa GL. Susceptibility of male and female mice to the nephrotoxic and hepatotoxic properties of chlorinated hydrocarbons. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1967;124(4):1163–6.
323. Some halogenated hydrocarbons. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Volume 20. Lyon; 1979.
324. Gehring PJ. Hepatotoxic potency of various chlorinated hydrocarbon vapours relative to their narcotic and lethal potencies in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1968;13(3):287–98.
325. Gradiski D, Magadur J, Baillet M, Danière M, Schuh M. Toxicité comparée des principaux solvants chlorés aliphatiques. *J Eur Toxicol.* 1974;7:247–54.
326. Smyth HF, Weil CS, West JS, Carpenter CP. An exploration of joint toxic action. II. Equitoxic versus equivolume mixtures. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1970;17(2):498–503.
327. Klingensmith JS, Lockard V, Mehendale HM. Acute hepatotoxicity and lethality of CCl₄ in chlordecone-pretreated rats. *Exp Mol Pathol.* 1983;39(1):1–10.
328. Klaassen CD, Plaa GL. Comparison of the biochemical alterations elicited in livers from rats treated with carbon tetrachloride, chloroform, 1,1,2-trichloroethane and 1,1,1-trichloroethane. *Biochem Pharmacol.* 1969;18(8):2019–27.
329. Lundberg I, Ekdahl M, Kronevi T, Lidums V, Lundberg S. Relative hepatotoxicity of some industrial solvents after intraperitoneal injection or

9. BIBLIOGRAFÍA

- inhalation exposure in rats. *Environ Res.* 1986;40(2):411–20.
330. Kennedy GL, Ferenz RL, Burgess BA. Estimation of acute oral toxicity in rats by determination of the approximate lethal dose rather than the LD50. *J Appl Toxicol.* 1986;6(3):145–8.
331. Klaassen CD, Plaa GL. Relative effects of various chlorinated hydrocarbons on liver and kidney function in dogs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1967;10(1):119–31.
332. Carbon Tetrachloride. World Health Organization. Geneva, 1999.
333. Brattin WJ, Glende EA, Recknagel RO. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *J Free Radic Biol Med.* 1985;1(1):27–38.
334. Weber LWD, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol.* 2003;33(2):105–36.
335. Rao PS, Mangipudy RS, Mehendale HM. Tissue injury and repair as parallel and opposing responses to CCl₄ hepatotoxicity: a novel dose-response. *Toxicology.* 1997;118(2-3):181–93.
336. Taniguchi M, Takeuchi T, Nakatsuka R, Watanabe T, Sato K. Molecular process in acute liver injury and regeneration induced by carbon tetrachloride. *Life Sci.* 2004;75(13):1539–49.
337. Puviani L, Cavallari G, Bonaiuto E, Cannistrà M, Zullo A, Pariali M, Pisano A, Atzeni F, Nardo B. Portal blood arterialization with an extracorporeal device to treat toxic acute hepatic failure in a swine model. *Int J Artif Organs.* 2014;37(11):847–53.
338. Nardo B, Montalti R, Puviani L, Pacilè V, Beltempo P, Bertelli R, Licursi M, Pariali M, Cianciavichia D. An experimental pilot study on controlled portal vein arterialization with an extracorporeal device in the swine model of partial liver resection and ischemia. *Int J Artif Organs.* 2006;29(9):912–8.
339. Pritchard D, Wright M, Sulsh S, Butler W. The assessment of chemically induced liver injury in rats.pdf. *J Appl Toxicol.* 1987;7(4):229–36.
340. Fawcett D. *Tratado de Histología*. 12th ed. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U.; 1995. 1044 p.
341. Saracyn M, Zdanowski R, Brytan M, Kade G, Nowak Z, Patera J, Dyrła P, Gil J, Wańkowicz Z. D-Galactosamine Intoxication in Experimental Animals: Is it Only an Experimental Model of Acute Liver Failure? *Med Sci Monit.* 2015;21:1469–77.
342. Traber PG, Dal Canto M, Ganger DR, Blei AT. Electron microscopic evaluation of brain edema in rabbits with galactosamine-induced fulminant hepatic failure: ultrastructure and integrity of the blood-brain barrier. *Hepatology.* 7(6):1272–7.
343. Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp Mol Pathol.* 1968;9(2):279–90.
344. Blitzer BL, Waggoner JG, Jones EA, Gralnick HR, Towne D, Butler J, Weise V,

9. BIBLIOGRAFÍA

- Kopin IJ, Walters I, Teychenne PF, Goodman DG, Berk PD. A model of fulminant hepatic failure in the rabbit. *Gastroenterology*. 1978;74(4):664–71.
345. Sielaff TD, Hu MY, Rollins MD, Bloomer JR, Amiot B, Hu WS, Cerra FB. An anesthetized model of lethal canine galactosamine fulminant hepatic failure. *Hepatology*. 1995;21(3):796–804.
346. Patzer JF, Block GD, Khanna A, Yin W-Y, Molmenti E, Gerber D, Kramer DJ, Scott VL, Aggarwal S, Wagner RA, Fulmer ML, Amiot BP, Mazariegos G V. D-galactosamine based canine acute liver failure model. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2002;1(3):354–67.
347. Jauregui HO, Mullon CJ, Trenkler D, Naik S, Santangini H, Press P, Muller TE, Solomon BA. In vivo evaluation of a hollow fiber liver assist device. *Hepatology*. 1995;21(2):460–9.
348. Shinoda M, Tilles AW, Kobayashi N, Wakabayashi G, Takayanagi A, Totsugawa T, Harada H, Obara H, Suganuma K, Berthiaume F, Shimazu M, Shimizu N, Tanaka N, Kitajima M, Tompkins RG, Toner M, Yarmush ML. A bioartificial liver device secreting interleukin-1 receptor antagonist for the treatment of hepatic failure in rats. *J Surg Res*. 2007;137(1):130–40.
349. Namisaki T, Yoshiji H, Kojima H, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Sakurai S, Yanase K, Kitade M, Yamazaki M, Asada K, Uemura M, Nakamura M, Fukui H. Salvage effect of the vascular endothelial growth factor on chemically induced acute severe liver injury in rats. *J Hepatol*. 2006;44(3):568–75.
350. Feng B, Wu S, Lv S, Liu F, Chen H, Yan X, Li Y, Dong F, Wei L. Metabolic profiling analysis of a D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced mouse model of fulminant hepatic failure. *J Proteome Res*. 2007;6(6):2161–7.
351. Takamura M, Matsuda Y, Yamagiwa S, Tamura Y, Honda Y, Suzuki K, Ichida T, Aoyagi Y. An inhibitor of c-Jun NH2-terminal kinase, SP600125, protects mice from D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatic failure by modulating BH3-only proteins. *Life Sci*. 2007;80(14):1335–44.
352. Tuñón M-J, Alvarez M, Culebras J-M, González-Gallego J. An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. *World J Gastroenterol*. 2009;15(25):3086–98.
353. Ingawale DK, Mandlik SK, Naik SR. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): a critical discussion. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014;37(1):118–33.
354. Mangipudy RS, Chanda S, Mehendale HM. Tissue repair response as a function of dose in thioacetamide hepatotoxicity. *Environ Health Perspect*. 1995;103(3):260–7.
355. Koblihová E, Lukšan O, Mrázová I, Ryska M, Červenka L. Hepatocyte transplantation attenuates the course of acute liver failure induced by thioacetamide in Lewis rats. *Physiol Res*. 2015;64(5):689–700.
356. Bruck R, Aeed H, Shirin H, Matas Z, Zaidel L, Avni Y, Halpern Z. The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats

9. BIBLIOGRAFÍA

- against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *J Hepatol.* 1999;31(1):27–38.
357. Bruck R, Aeed H, Avni Y, Shirin H, Matas Z, Shahmurov M, Avinoach I, Zozulya G, Weizman N, Hochman A. Melatonin inhibits nuclear factor kappa B activation and oxidative stress and protects against thioacetamide induced liver damage in rats. *J Hepatol.* 2004;40(1):86–93.
358. Harputluoglu MMM, Demirel U, Ciralik H, Temel I, Firat S, Ara C, Aladag M, Karıncaoglu M, Hilmioglu F. Protective effects of *Ginkgo biloba* on thioacetamide-induced fulminant hepatic failure in rats. *Hum Exp Toxicol.* 2006;25(12):705–13.
359. Luo M, Dong L, Li J, Wang Y, Shang B. Protective effects of pentoxifylline on acute liver injury induced by thioacetamide in rats. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(8):8990–6.
360. Farivar M, Wands JR, Isselbacher KJ, Bucher NL. Effect of insulin and glucagon on fulminant murine hepatitis. *N Engl J Med.* 1976;295(27):1517–9.
361. Lavi E, Gilden DH, Highkin MK, Weiss SR. The organ tropism of mouse hepatitis virus A59 in mice is dependent on dose and route of inoculation. *Lab Anim Sci.* 1986;36(2):130–5.
362. Tuñón MJ, Sanchez-Campos S, Garcia-Ferreras J, Alvarez M, Jorquera F, Gonzalez-Gallego J. Rabbit hemorrhagic viral disease: characterization of a new animal model of fulminant liver failure. *J Lab Clin Med.* 2003;141(4):272–8.
363. Gould AR, Kattenbelt JA, Lenghaus C, Morrissy C, Chamberlain T, Collins BJ, Westbury HA. The complete nucleotide sequence of rabbit haemorrhagic disease virus (Czech strain V351): use of the polymerase chain reaction to detect replication in Australian vertebrates and analysis of viral population sequence variation. *Virus Res.* 1997;47(1):7–17.
364. Han D-W. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol.* 2002;8(6):961–5.
365. Zhang Y, Cai W, Huang Q, Gu Y, Shi Y, Huang J, Zhao F, Liu Q, Wei X, Jin M, Wu C, Xie Q, Wan B, Zhang Y. Mesenchymal stem cells alleviate bacteria-induced liver injury in mice by inducing regulatory dendritic cells. *Hepatology.* 2014;59(2):671–82.
366. Carakostas M, Gossett K, Church G, Cleghorn B. Evaluating toxin-induced hepatic injury in rats by laboratory results and discriminant analysis. *Vet Pathol.* 1986;23(3):264–9.
367. O'Brien P, Slaughter M, Polley S, Kramer K. Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats. *Lab Anim.* 2002;36:313–21.
368. Goñi L, Caridad A, Diuris B, Amelia P, González M, Arteaga BO, Bada ME. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cenp: SPRD (Hematological and biochemical

9. BIBLIOGRAFÍA

- parameters in Sprague Dawley laboratory rats breed in CENPALAB , Cenp : SPRD). *Rev electrónica Vet.* 2011;12(11):1–10.
369. AVMA Guidelines for Euthanasia of Animals: 2013 Edition [Internet].
370. Ramaiah SK, Soni MG, Bucci TJ, Mehendale HM. Diet restriction enhances compensatory liver tissue repair and survival following administration of lethal dose of thioacetamide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998;150(1):12–21.
371. Blain RB, Reeves R, Ewald KA, Leonard D, Calabrese EJ. Susceptibility to chlordecone-carbon tetrachloride induced hepatotoxicity and lethality is both age and sex dependent. *Toxicol Sci.* 1999;50(2):280–6.
372. Russell, WMS and Burch R. *The Principles of Humane Experimental Technique.* London: Methuen; 1959.
373. Bénichou C. Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. *J Hepatol.* 1990;11(2):272–6.
374. Fernández Hernández JA, Robles Campos R, Hernández Marín C, Hernández Agüera Q, Sánchez Bueno F, Ramírez Romero P, Rodríguez González JM, Luján Monpeán JA, Acosta Villegas F, Parrilla Paricio P. Fulminant hepatic failure and liver transplantation. Experience of the Hospital Virgen de la Arrixaca. *Gastroenterol y Hepatol.* 26(6):333–40.
375. Amacher DE. Serum transaminase elevations as indicators of hepatic injury following the administration of drugs. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1998;27(2):119–30.
376. Wahi P, Tandon H, Bharadwaj T. Acute carbon tetrachloride liver injury. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1955;37(4):305–14.
377. Grice HC, Barth ML, Cornish HH, Foster G V, Gray RH. Correlation between serum enzymes, isozyme patterns and histologically detectable organ damage. *Food Cosmet Toxicol.* 1971;9(6):847–55.
378. Alhassan AJ, Sule MS, Aliyu SA, Aliyu MD. Ideal hepatotoxicity model in rats using Carbon Tetrachloride (CCl₄). *Bayero J Pure Appl Sci.* 2009;2(2):185–7.
379. Yun J-W, Kim C-W, Bae I-H, Park Y-H, Chung J-H, Lim K-M, Kang K-S. Determination of the key innate genes related to individual variation in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity using a pre-biopsy procedure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009;239(1):55–63.
380. Ramaiah SK. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(9):1551–7.
381. Nacif LS, Ferreira AO, Maria DA, Kubrusly MS, Molan N, Chaib E, D’Albuquerque LC, Andraus W. Which is the best route of administration for cell therapy in experimental model of small-for size syndrome in rats? *Acta cirúrgica Bras / Soc Bras para Desenvolv Pesqui em Cir.* 2015;30(2):100–6.
382. Deng L, Liu G, Wu X, Wang Y, Tong M, Liu B, Wang K, Peng Y, Kong X. Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells Efficiently Rescue Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Failure in Mouse. *Sci World J.* 2014;2014:1–8.
383. Chen G, Jin Y, Shi X, Qiu Y, Zhang Y, Cheng M, Wang X, Chen C, Wu Y, Jiang F,

- Li L, Zhou H, Fu Q, Liu X. Adipose-derived stem cell-based treatment for acute liver failure. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6:40.
384. Li D, Fan J, He X, Zhang X, Zhang Z, Zeng Z, Ruan M, Cai L. Therapeutic effect comparison of hepatocyte-like cells and bone marrow mesenchymal stem cells in acute liver failure of rats. *Int J Clin Exp Pathol.* e-Century Publishing Corporation; 2015;8(1):11–24.
385. Saidi R, Rajeshkumar R, Shariftabrizi A, Zimmerman A, Walter O. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Liver Regeneration. *J Invest Surg.* 2015;1–6.
386. Winkler S, Hempel M, Brückner S, Mallek F, Weise A, Liehr T, Tautenhahn H-M, Bartels M, Christ B. Mouse white adipose tissue-derived mesenchymal stem cells gain pericentral and periportal hepatocyte features after differentiation in vitro, which are preserved in vivo after hepatic transplantation. *Acta Physiol (Oxf).* 2015;215(2):89–104.
387. Lin H, Xu R, Zhang Z, Chen L, Shi M, Wang F-S. Implications of the immunoregulatory functions of mesenchymal stem cells in the treatment of human liver diseases. *Cell Mol Immunol.* 2011;8(1):19–22.
388. Christ B, Brückner S, Winkler S. The Therapeutic Promise of Mesenchymal Stem Cells for Liver Restoration. *Trends Mol Med.* 2015;21(11):673–86.
389. Tautenhahn H-M, Brückner S, Baumann S, Winkler S, Otto W, von Bergen M, Bartels M, Christ B. Attenuation of Postoperative Acute Liver Failure by Mesenchymal Stem Cell Treatment Due to Metabolic Implications. *Ann Surg.* 2015;(Epub ahead of print).
390. Rennert RC, Sorkin M, Januszyk M, Duscher D, Kosaraju R, Chung MT, Lennon J, Radiya-Dixit A, Raghvendra S, Maan ZN, Hu MS, Rajadas J, Rodrigues M, Gurtner GC. Diabetes impairs the angiogenic potential of adipose-derived stem cells by selectively depleting cellular subpopulations. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(3):79.
391. Takeda M, Yamamoto M, Isoda K, Higashiyama S, Hirose M, Ohgushi H, Kawase M, Yagi K. Availability of bone marrow stromal cells in three-dimensional coculture with hepatocytes and transplantation into liver-damaged mice. *J Biosci Bioeng.* 2005;100(1):77–81.
392. Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells.* 2011;29(1):11–9.
393. Hernanda PY, Pedroza-Gonzalez A, Sprengers D, Peppelenbosch MP, Pan Q. Multipotent mesenchymal stromal cells in liver cancer: implications for tumor biology and therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1846(2):439–45.
394. Pan Q, Fouraschen SMG, de Ruiter PE, Dinjens WNM, Kwekkeboom J, Tilanus HW, van der Laan LJW. Detection of spontaneous tumorigenic transformation during culture expansion of human mesenchymal stromal cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2014;239(1):105–15.

10. ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS

Índice de tablas

Tabla 1	Causas conocidas de IHA.	34
Tabla 2	Clasificación de la encefalopatía hepática (criterios de West Haven).	37
Tabla 3	Parámetros de laboratorio a analizar inicialmente en la IHA.	40
Tabla 4	Modelos pronósticos en la IHA.	43
Tabla 5	Beneficios de la hipotermia terapéutica en la IHA.	47
Tabla 6	Indicaciones de la terapia con MARS® (Gambro GmbH, Hechingen, Baden-Württemberg, Alemania).	50
Tabla 7	Principales estudios controlados con terapia MARS® (Gambro GmbH, Hechingen, Baden-Württemberg, Alemania).	50
Tabla 8	Principales estudios comparativos de terapia MARS® (Gambro GmbH, Hechingen, Baden-Württemberg, Alemania) frente a Prometheus® (Fresenius Medical Care GmbH, Bad Homburg von der Höhe, Hesse, Alemania).	52
Tabla 9	Dispositivos bio-artificiales utilizados en pacientes con IHA.	54
Tabla 10	Supervivencia postrasplante en casos de IHA por todas las causas en España.	57
Tabla 11	Comparación de la expresión de marcadores de superficie entre MSCs y fibroblastos.	62
Tabla 12	Resumen de las aplicaciones de las ASCs. A. Áreas de investigación con ASCs. B. Patologías en las que se han utilizado ASCs (experimental). C. Ensayos clínicos con ASCs.	64
Tabla 13	Patologías en las que se ha realizado el TCH.	67
Tabla 14	Estudios prospectivos de células madre de médula ósea en pacientes con cirrosis. Modificado de Margini et al., 2014.	75
Tabla 15	Modelos porcinos de IHA por desvascularización transitoria.	84
Tabla 16	Estudios de letalidad del CCl ₄ .	88
Tabla 17	Resumen de modelos experimentales.	97

10. ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS

Tabla 18	Rango de valores normales de AST, ALT, FA y B _T para ratas SD macho de 5 – 8 semanas de edad.	114
Tabla 19	Sistema de puntuación de la necrosis hepática, en función de su extensión en relación al campo del microscopio.	116
Tabla 20	Valores AST, ALT, FA y B _T de cada rata, según la dosis y el tiempo, en el estudio de dosis.	136
Tabla 21	AST, descriptores estadísticos de los grupos del estudio de dosis.	137
Tabla 22	ALT, descriptores estadísticos de los grupos del estudio de dosis.	137
Tabla 23	FA, descriptores estadísticos de los grupos del estudio de dosis.	138
Tabla 24	B _T , descriptores estadísticos de los grupos del estudio de dosis.	138
Tabla 25	Significación estadística de AST, ALT, FA y B _T , según el tiempo, la dosis y la interacción de la dosis en función del tiempo.	142
Tabla 26	Significación estadística de la variación sérica de AST, ALT, FA y B _T en función del tiempo, sin y con transformación logarítmica.	142
Tabla 27	Significación estadística de la variación sérica del log ₁₀ (FA) según la dosis en función del tiempo.	142
Tabla 28	Valores AST, ALT, FA y B _T de cada rata, según la dosis y el tiempo, en el grupo control con CCl ₄ del estudio de IHA.	152
Tabla 29	AST, descriptores estadísticos de los grupos del estudio de inducción de IHA con CCl ₄ y tratamiento con ASCs.	153
Tabla 30	ALT, descriptores estadísticos de los grupos del estudio de inducción de IHA con CCl ₄ y tratamiento con ASCs.	153
Tabla 31	FA, descriptores estadísticos de los grupos del estudio de inducción de IHA con CCl ₄ y tratamiento con ASCs.	154
Tabla 32	B _T , descriptores estadísticos de los grupos del estudio de inducción de IHA con CCl ₄ y tratamiento con ASCs.	154
Tabla 33	Log-Rank test (Mantel-Cox); análisis estadístico de la supervivencia.	162

10. ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS

Tabla 34	Descriptores estadísticos del número de ASCs por órgano, tiempo y grupo.	165
Tabla 35	Análisis comparativo entre el grupo control y el grupo de IHA del número de ASCs en hígado.	166
Tabla 36	Análisis comparativo entre el grupo control y el grupo de IHA del número de ASCs en bazo.	167
Tabla 37	Análisis comparativo entre el grupo control y el grupo de IHA del número de ASCs en pulmón.	167
Tabla 38	Resumen selectivo de los factores estimulados por las MSCs en diferentes patologías hepáticas.	205

Índice de figuras

Figura 1	Clasificaciones de la IHA. A: O'Grady et al.; B: Bernau et al.; C: Mochida et al.	32
Figura 2	Causas de IHA en España.	35
Figura 3	Fisiopatología de la IHA. Esquema.	35
Figura 4	MARS® con Prismaflex® (<i>Gambro GmbH, Hechingen, Baden-Württemberg, Alemania</i>).	51
Figura 5	Esquema del funcionamiento de MARS® (<i>Gambro GmbH, Hechingen, Baden-Württemberg, Alemania</i>).	51
Figura 6	Representación tridimensional del lobulillo hepático y de la red sinusoidal y canalicular biliar, que desemboca en los canales de Hering y, éstos a su vez, en los conductos biliares.	72
Figura 7	Anatomía hepática de la rata.	83
Figura 8	Representación esquemática del lobulillo poligonal clásico y del acino elipsoidal hepáticos.	92
Figura 9	A. Caja de policarbonato con pienso y agua <i>ad libitum</i> . B. Punción intraperitoneal de CCl ₄ . C. Respirador de anestesia. D. Inducción anestésica. E. Laparotomía media y exposición de órganos abdominales.	118
Figura 10	Cultivo de ASCs a las 48h.	119
Figura 11	Citómetro de flujo BD FACSCalibur™ (<i>Becton Dickinson Biosciences, Becton, Dickinson and Company, San José, California, EE.UU.</i>).	119
Figura 12	Caracterización fenotípica de ASCs de ratas Sprague-Dawley por citometría de flujo, en pase 4.	119
Figura 13	A. Microscopio óptico Zeiss Axio Lab.A1 (<i>Carl Zeiss Microscopy® GmbH, Oberkochen, Alemania</i>). B. Microscopio de fluorescencia Leica DMI 6000B (<i>Leica Microsystems® GmbH, Wetzlar, Alemania</i>).	119

10. ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS

Figura 14	Necropsia.	
	A. Superficie hepática cubierta con material fibrinoso.	
	B. moteado con aspecto de “nuez moscada”.	144
Figura 15	Necrosis hepática en grupo D ₅ a las 24h. HE, 10x.	146
Figura 16	Necrosis hepática en grupo D ₅ a las 24h. HE, 40x.	146
Figura 17	Necrosis hepática en grupo D ₅ a las 48h. HE, 10x.	147
Figura 18	Necrosis hepática en grupo D ₅ a las 48h. HE, 40x.	147
Figura 19	Necrosis hepática en grupo D ₅ a los 7 días. HE, 10x.	148
Figura 20	Necrosis hepática en grupo D ₅ a los 7 días. HE, 40x.	148
Figura 21	Histología hepática en grupo D ₀ a los 7 días. HE, 10x.	149
Figura 22	Histología hepática en grupo D ₀ a los 7 días. HE, 40x.	149
Figura 23	Histología hepática en grupo CCl ₄ + ASCs a las 24h. HE, 10x.	159
Figura 24	Histología hepática en grupo CCl ₄ + ASCs a las 24h. HE, 40x.	159
Figura 25	Histología hepática en grupo CCl ₄ + ASCs a las 48h. HE, 10x.	160
Figura 26	Histología hepática en grupo CCl ₄ + ASCs a las 48h. HE, 40x.	160
Figura 27	Histología hepática en grupo CCl ₄ + ASCs a los 7 días. HE, 10x.	161
Figura 28	Histología hepática en grupo CCl ₄ + ASCs a los 7 días. HE, 40x.	161
Figura 29	Hígado a 24h, grupo ASCs; tinción con PKH26.	168
Figura 30	Hígado a 24h, grupo CCl ₄ + ASCs; tinción con PKH26.	169
Figura 31	Hígado a 48h, grupo ASCs; tinción con PKH26.	170
Figura 32	Hígado a 48h, grupo CCl ₄ + ASCs; tinción con PKH26.	171
Figura 33	Hígado a 7 días, grupo ASCs; tinción con PKH26.	172
Figura 34	Hígado a 7 días, grupo CCl ₄ + ASCs; tinción con PKH26.	173
Figura 35	Pulmón a 24h, grupo ASCs; tinción con PKH26.	174

10. ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS

Figura 36	Pulmón a 24h, grupo CCl ₄ + ASCs; tinción con PKH26.	175
Figura 37	Pulmón a 48h, grupo ASCs; tinción con PKH26.	176
Figura 38	Pulmón a 48h, grupo CCl ₄ + ASCs; tinción con PKH26.	177
Figura 39	Pulmón a 7 días, grupo ASCs; tinción con PKH26.	178
Figura 40	Pulmón a 7 días, grupo CCl ₄ + ASCs; tinción con PKH26.	179
Figura 41	Bazo a 24h, grupo ASCs; tinción con PKH26.	180
Figura 42	Bazo a 24h, grupo CCl ₄ + ASCs; tinción con PKH26.	181
Figura 43	Bazo a 48h, grupo ASCs; tinción con PKH26.	182
Figura 44	Bazo a 48h, grupo CCl ₄ + ASCs; tinción con PKH26.	183
Figura 45	Bazo a 7 días, grupo ASCs; tinción con PKH26.	184
Figura 46	Bazo a 7 días, grupo CCl ₄ + ASCs; tinción con PKH26.	185

Índice de gráficas

Gráfica 1	Distribución de la media de la AST, por grupo de dosis, a las 24h, 48h y 7 días de la inyección de CCl ₄ .	139
Gráfica 2	Distribución de la media de la ALT, por grupo de dosis, a las 24h, 48h y 7 días de la inyección de CCl ₄ .	139
Gráfica 3	Distribución de la media de la FA, por grupo de dosis, a las 24h, 48h y 7 días de la inyección de CCl ₄ .	140
Gráfica 4	Distribución de la media de la B _T , por grupo de dosis, a las 24h, 48h y 7 días de la inyección de CCl ₄ .	140
Gráfica 5	Curvas de Kaplan-Meier; análisis estadístico de la supervivencia.	145
Gráfica 6	Niveles plasmáticos medios de AST, representados mediante su transformación logarítmica, y con intervalos de confianza del 95%.	156
Gráfica 7	Niveles plasmáticos medios de ALT, representados mediante su transformación logarítmica, y con intervalos de confianza del 95%.	156
Gráfica 8	Niveles plasmáticos medios de FA, representados mediante su transformación logarítmica, y con intervalos de confianza del 95%.	157
Gráfica 9	Niveles plasmáticos medios de B _T , representados mediante su transformación logarítmica, y con intervalos de confianza del 95%.	157
Gráfica 10	Curvas de Kaplan-Meier; análisis estadístico de la supervivencia.	163
Gráfica 11	Número medio de ASCs en función del tiempo y órgano en los grupos control e IHA.	166

11. ANEXOS

ANEXO 1 Artículo: "Systemic treatment of acute liver failure with adipose derived stem cells". J Invest Surg, 2015;28(2):120-6

Journal of Investigative Surgery, 28, 120–126, 2015
Copyright © 2015 Informa Healthcare USA, Inc.
ISSN: 0894-1939 print / 1521-0553 online
DOI: 10.3109/08941939.2014.987407

informa
healthcare

NEW METHODOLOGY

Systemic Treatment of Acute Liver Failure with Adipose Derived Stem Cells

Isabel Pascual-Migueláñez,¹ Javier Salinas-Gomez,² David Fernandez-Luengas,¹
Karen Villar-Zarra,³ Luz Vega Clemente,⁴ Mariano Garcia-Arranz,⁴
Damian Garcia Olmo^{2,4}

¹Hospital Universitario Infanta Sofía, Spain, ²Hospital Universitario La Paz, Spain, ³Hospital Universitario La Princesa, Spain, ⁴Instituto de Investigación IdiPaz, Spain

ABSTRACT

Purpose of the study: The definitive treatment for liver failure is, currently, liver transplantation. Research into other possible treatments, focused on achieving regeneration of the liver parenchyma, have led to the development of methods to generate hepatocytes from stem cells. In our study, we transplant allogenic adipose-derived stem cells (ASCs), not previously differentiated to hepatocytes, to treat acute liver failure induced by intraperitoneal administration of carbon tetrachloride (CCl₄) in a Sprague-Dawley rat model. **Material and Methods:** The ASCs were delivered via the tail vein, having previously been labeled with PKH26, a fluorescent membrane marker. Two control groups were established, Group 1 ($n = 15$) consisting of olive oil (5 mL/kg) and Group 2 ($n = 15$): 1×10^6 PKH26-labeled ASCs. Further, two study groups, Group 3 ($n = 30$): CCl₄ dissolved in olive oil and Group 4 ($n = 30$): CCl₄ dissolved in olive oil and 1×10^6 PKH26-labeled ASCs completed the experimental design. **Results:** Blood samples were analyzed, finding AST and ALT levels significantly higher in treatment over control groups at 24 and 48 hours. The mortality rates were statistically different between control groups and Group 3 (Group 1-3 $p = .04$, Group 2-3 $p = .04$) and between Groups 3 and 4 ($p = .02$). Examining the liver parenchyma, a significantly higher number of ASCs were observed in Group 4 than in Group 2 at all time points ($p = .00$). **Conclusions:** The intravenous injection of allogenic ASCs in this model of CCl₄-induced liver failure reduced the mortality in treated animals. ASCs injected in the rat tail vein were found in the liver in animals with induced acute liver failure.

Keywords: adult stem cells; mesenchymal stem cells; liver transplant; liver failure; fulminant liver failure

INTRODUCTION

Acute liver failure is a major human health problem normally treated using liver transplantation. Great efforts are being made to identify new sources of hepatocytes in order to develop alternative approaches to treat this condition [1–7]. Adipose tissue is currently the most accessible source of adult mesenchymal stem cells (MSCs). This type of stem cells has the *in vitro* capacity to trans-differentiate to hepatocyte-like cells [8]. However, poor *in vitro* proliferation and lack of function of induced hepatocytes are the major concerns about this therapeutic approach. In most studies of stem cell therapy on acute liver failure, the MSCs used are of

bone marrow origin [9,10]. Due to the similarity among MSCs derived from many types of adult human tissue, adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) are tested in this study as a sole therapy to treat liver damage.

Systemic administration via the tail vein of the rat was chosen for the route of injection. Transplanted ASCs are previously marked with PKH26, a fluorescent membrane marker, in order to explore whether the cells are able to reach the liver by peripheral intravenous infusion. In addition to liver samples, spleen and lung tissue histological sections were collected in order to study the ASCs fate after systemic injection.

Received 4 June 2014; accepted 10 November 2014.

Address correspondence to Isabel Pascual Migueláñez, Paseo de Europa, 34. 28702 San Sebastián de los Reyes, Madrid, Spain. E-mail: isabelpasmi@hotmail.com

MATERIAL AND METHODS

Experimental Procedures

Ninety-two male Sprague-Dawley rats, OFA strain (Charles River Laboratories, Spain), 8 weeks old and weighing between 250 and 275 g, were used in the study. Ninety rats were divided into four treatment groups and two rats were used to obtain the adipose tissue necessary to isolate stem cells. All animals were housed with free access to food and water in a temperature-controlled room with relative humidity 40–70% and with a 12-hour dark/light-cycle. A one week period of acclimation was set. Procedures were carried out under isoflurane anesthesia (Abbott Laboratories, Madrid, Spain) at 5% in an induction chamber, followed by 2% isoflurane maintenance dose. Analgesia was provided with subcutaneous morphine at a dose of 1 mg/kg (Braun Medical, Barcelona, Spain). The animals were operated on under aseptic conditions and antibiotic prophylaxis was not given. Animals were sacrificed under isoflurane anesthesia at the dose mentioned by cardiac injection of 2 mL potassium chloride (UCB Pharma, Barcelona, Spain). The experimental protocol was approved by La Paz University Hospital Animal Care Committee.

The following groups were established:

- Group 1 (Control oil): Fifteen rats were administered a single dose of olive oil at a dose of 5 mL/kg via intraperitoneal injection.
- Group 2 (Control ASCs): Fifteen rats were administered a dose of 1×10^6 PKH26-labeled ASCs intravenously through the tail vein.
- Group 3 (CCl₄): Thirty rats were administered a single dose of carbon tetrachloride (CCl₄, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) via intraperitoneal injection. The CCl₄ was dissolved in olive oil to a final concentration of 25% and injected at a dose of 5 mL/kg.
- Group 4 (CCl₄ + ASCs): Thirty rats were administered a single dose of CCl₄ dissolved in olive oil to a final concentration of 25% via intraperitoneal injection at a dose of 5 mL/kg. Thirty minutes after CCl₄ injection, a dose of 1×10^6 PKH26-labeled ASCs was also administered intravenously through the tail vein.

Blood samples from each rat were obtained at 24 hours, 48 hours and 7 days and levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were measured [11–13]. Control and experimental rats were euthanized at the same times in groups of five animals (Groups 1 and 2) or ten animals (Groups 3 and 4). Mortality was recorded for each group. Liver, lung and spleen tissue samples were collected, preserved in 10% buffered formalin and embedded in paraffin for routine histological analysis.

Liver histology was assessed by light microscopy using hematoxylin-eosin stained sections.

Adipose Stem Cell Isolation [14–16] and Characterization

Subcutaneous fat was removed from two Sprague-Dawley rats, washed with sterile phosphate-buffered saline and digested with type I collagenase (0.75 per cent; Gibco, Paisley, UK) for 30 min at 37°C to release the cellular fraction. Cells were resuspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium and then plated in culture dishes at a concentration of $2-3 \times 10^4$ cells/cm².

Cell cultures were analysed by flow cytometry using FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) after staining with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies CD90, CD29, CD45 and CD11b (Serotec, Spain). Data acquisition and analysis were performed using the CELLQuest PRO software program (BD Biosciences). A high expression was found of CD90 (>95%) and CD29 (>95%) and lack of surface markers CD 45 (<45%) and CD11b (<5%) supporting mesenchymal phenotype of isolated cells from adipose tissue.

Subconfluent ASCs were labeled with PKH26 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), a red fluorescent dye which primarily binds to the cell membrane. PKH 26-labelled ASCs in liver, lung and spleen tissue were detected by fluorescence microscopy with a DFC 350 FX R2 camera (Leica, Cambridge, UK). The field cell count is the mean from five randomly selected fields in each sample.

Statistical Analysis

All data were analyzed with SAS 9.1.3. The results are given as the mean \pm SD. Statistical analysis of quantitative data was conducted with a linear regression model using the Bonferroni correction. Mortality was compared between groups with log-rank tests. A P value <0.05 was considered significant.

RESULTS

Analysis of blood samples showed acute liver damage in groups where CCl₄ was injected. ALT and AST levels were found to be significantly higher at 24 and 48 hours in Groups 3 (CCl₄) and 4 (CCl₄ + ASCs) than in the control groups ($p < 0.05$). On day 7, difference of ALT levels between control groups and CCl₄ treatment groups was not significant ($p > 0.05$) and only AST remained different regarding control Group 1 (Groups 1-3 $p = .03$; Groups 1-4 $p = .001$). No differences were found on ALT and AST levels when ASCs are injected in CCl₄-treated rats during any time of the study as opposed to only CCl₄-treated rats (Figure 1).

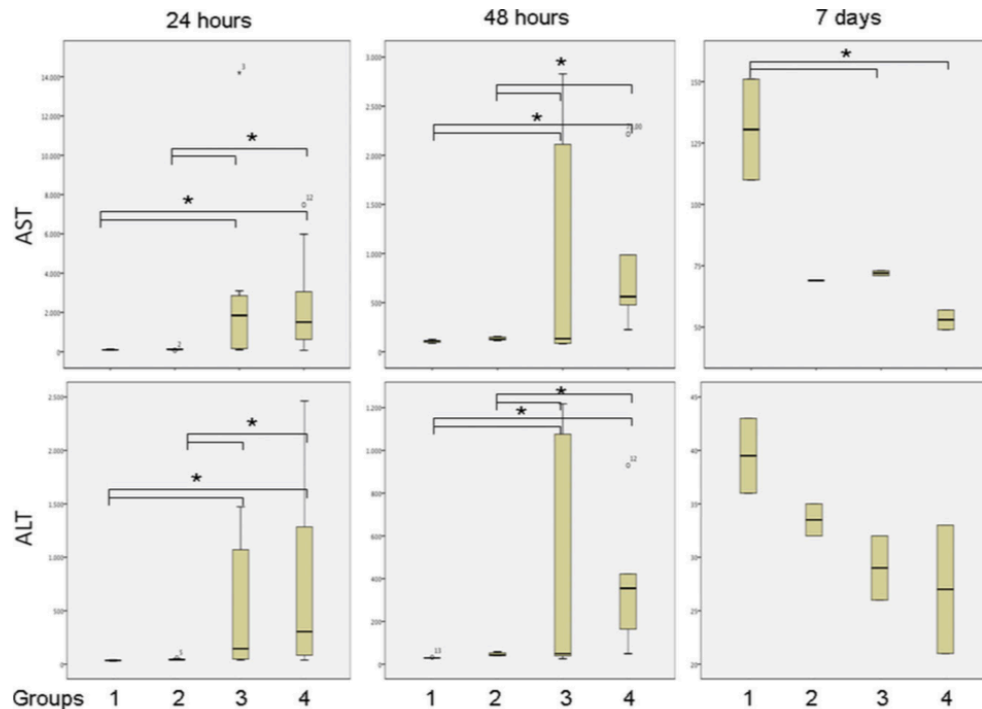
122 Isabel Pascual-Migueláñez *et al.*

FIGURE 1. Liver transaminases AST and ALT evolution at 24 hours, 48 hours and 7 days. Group 1: Control oil, Group 2: Control ASCs, Group 3: CCl₄, Group 4: CCl₄ and ASCs. Values are expressed as median and quartiles. * $p < 0.05$.

Mortality Rate

No animals in either of the control groups died. Seven deaths (23.3%) were recorded in Group 3 (CCl₄), six of them at 24 hours and one at 48 hours, and one in Group 4 (CCl₄ + ASCs) at 24 hours (3.3%). There were significant differences in mortality rate between the control groups and Group 3 ($p = .04$) and between Groups 3 and 4 ($p = .026$). No significant differences were found on mortality rate between control groups and Group 4 ($p = .48$) (Figure 2).

Histopathological Findings

Hematoxylin-eosin analysis of the liver parenchyma confirmed that in control groups, there was no inflammation or necrosis. Furthermore, no changes in hepatocytes were observed.

In Group 3 (CCl₄), we found intense inflammatory infiltrate with per-hepatic vein necrosis (stages III/IV) and microvesicular steatosis in the liver parenchyma with ballooned cells but no fibrosis at 24 hours. At 48 hours, small foci of cytolysis with isolated liver necrosis (stages I/IV) were identified in the hepatic

vein area. In the liver parenchyma, mild sinusoidal dilatation and nodular regenerative hyperplasia were observed but without inflammatory infiltrate or fibrosis. On day 7 no inflammatory infiltrate, necrosis or fibrosis were observed in the liver parenchyma.

In Group 4 (CCl₄ + ASCs), the same changes were seen at 24 hours as in Group 3 (CCl₄). These were characterized by intense inflammatory infiltrate and

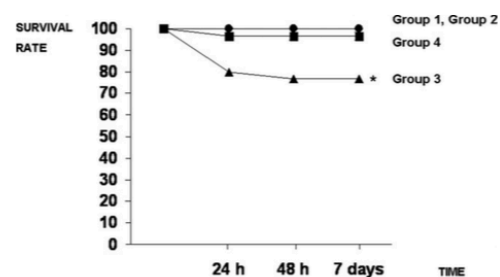


FIGURE 2. Survival curve of each group at 24 hours, 48 hours and 7 days. Group 1: Control oil, Group 2: Control ASCs, Group 3: CCl₄, Group 4: CCl₄ and ASCs.

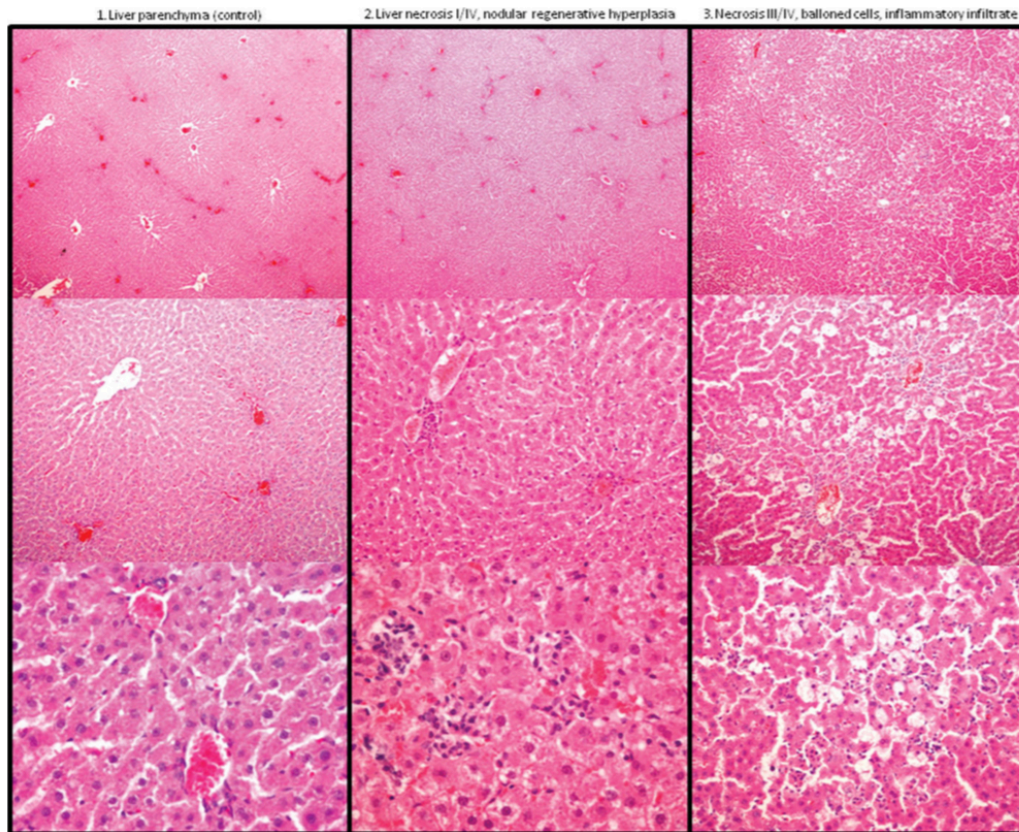


FIGURE 3. Histopathological findings on liver parenchyma. 1. Liver parenchyma as seen in Control Groups 1 and 2. 2. Liver necrosis (I/IV) as seen in Group 3 at 48 hours. 3. Liver necrosis (III/IV) with intense inflammatory infiltrate and ballooned cells as seen in Group 3 at 24 hours and Group 4 at 24 and 48 hours.

necrosis in the hepatic vein region and microvesicular steatosis in the liver parenchyma with the presence of ballooned cells. In contrast, at 48 hours, the findings showed more inflammatory infiltrate with per-hepatic vein necrosis (stage III/IV) and vacuolated cells. On day 7 the architecture of the liver parenchyma was intact with no histological changes in the portal spaces, and no fibrosis or inflammatory infiltrate was found (Figure 3).

Fluorescence Microscopy

Using fluorescence microscopy, PKH26-labeled ASCs were detected in the lung and spleen in all individuals in Groups 2 (ASCs) and 4 (CCl₄ + ASCs). There were significant differences in the ASC count in the two groups in the lung at 24 hours and in the spleen at 48 hours ($p < 0.05$). In the case of the liver parenchyma,

significantly more ASCs were observed in Group 4 (CCl₄ + ASCs) than in Group 2 (ASCs) at all time points ($p < 0.01$).

DISCUSSION

The only definitive treatment for refractory acute hepatic failure is liver transplantation but scarcity of organs and urgency associated with this disease mean that transplant is not always an option. For this reason, there is ongoing research into regeneration of the liver parenchyma (both in the laboratory and in animal models). This research attempts to obtain functional hepatocytes that could reestablish liver function and thus, avoid the need for a whole-organ transplantation [17,18]. The generation of hepatocytes derived from stem cells has been achieved *in vitro*, but their subsequent transplantation in animals with induced liver

124 Isabel Pascual-Migueláñez *et al.*

failure has not improved their survival. In contrast, in recent studies with animal models of acute liver failure, it has been observed that the injection of bone marrow derived MSCs [19–22] that have not been previously differentiated into hepatocytes does improve the biochemical markers of liver dysfunction and survival of treated animals. In our study, MSCs were transplanted being derived from adipose tissue. This represents a more accessible source of MSCs than bone marrow. Systemic administration of the cells was chosen over other routes such as portal vein or liver parenchyma injection, due to its simplicity. This type of administration also guarantees sufficient vein diameter in order to avoid cell clot formation during ASCs injection and would be reproducible in humans if therapeutic efficacy is demonstrable. Moreover, a systemic effect of stem cells using this route is being evaluated and has a two part thrust. One part of this search is for local liver regeneration which could be achieved also by portal vein injection or cell transplantation into liver parenchyma. The second part of this work is an assessment of systemic ASCs effect in acute liver necrosis disease.

Experimental models of acute liver failure based on the injection of CCl₄ as a hepatotoxic agent vary widely depending on the type of animal and the dose used. The rat breed in the current study (Sprague-Dawley OFA strain), when injected with a dosage of 5 mL/kg, was sufficient to cause liver necrosis with a 23.3% mortality rate in the first 48 hours. Liver transaminases AST and ALT have been widely used to assess hepatic failure in animal models but it has been discussed correlation between liver enzymes level in peripheral blood and severity of hepatic failure. Some authors describe histopathological examination of liver parenchyma as the best technique to demonstrate and measure the degree of liver injury [23].

In this study, the injection of ASCs failed to improve the blood markers of liver function, although the mortality of rats with liver failure was significantly lower after transplantation of stem cells (3.3%). This difference, as opposed to other studies in which an improvement in liver transaminases was observed after administration of MSCs, could be due to the fact that our model is a high-mortality model with proven severe hepatic necrosis after CCl₄ injection. In the group of animals with induced liver failure (Group 3), the most severe cases died, and biological markers of liver function were measured in survival rats, presumably with less severe liver failure.

Transplantation of ASCs does not attenuate this type of severe liver necrosis since no histological improvement was found in hepatic samples. Histopathological findings show that CCl₄ induces profound changes in liver parenchyma at 24 hours (Intense inflammatory infiltrate with perivenular necrosis, stages III/IV) that improve spontaneously at 48 hours (No inflammatory

infiltrate with isolated liver necrosis, stages I/IV). In contrast, in rats with liver damage treated with systemic ASCs, the findings at 24 hours remained constant at 48 hours although a higher number of animals survived even with this severe liver injury. Systemic ASCs therapy does not ameliorate CCl₄-induced liver necrosis but in some way reduces its mortality.

Although the mechanism of action has not yet been elucidated, immunomodulatory and anti-inflammatory properties of stem cells may provide a protective effect against liver failure [9, 24–26]. The possibility that the transplanted stem cells, which have differentiated into functional hepatocytes and regenerated liver tissue within 48 hours, seems to be a less likely answer. Such an effect on the immune system has already been explored both in the prevention and treatment of host-graft disease and in other autoimmune and inflammatory digestive diseases [24–28].

Hepatic necrosis led to stem cell recruitment to the liver. After the intravenous injection of ASCs, these cells were observed in the liver when there was liver failure. Furthermore, there was a significant difference in the stem cell count compared to that in healthy liver tissue at all time points studied. Spleen and lung are tissues of stem cell engraftment when MSCs are injected intravenously [29]. The stem cell count in the spleen in this study was significantly lower in animals with liver failure than in controls at 48 hours. Forty-eight hours is precisely the time when there was a large increase in ASCs in the damaged liver tissue which could be attributed to hepatic recruitment taking priority over splenic circulation. The fact that labeled ASCs were found in the injured liver tissue when injected systemically suggests that the routes used for the administration of stem cells should be reconsidered [6,18]. In other studies, cells have been injected into the portal vein or the splenic parenchyma, even though the systemic venous system is more accessible and makes the procedure much easier. This would also allow for transplanting a larger dose of cells and thus, avoid the need to design scaffolds as a vehicle for delivering stem cells [10].

Further research is required to explore whether ASCs found in the liver are effective in the long term at regenerating the liver parenchyma in chronic liver diseases, thereby making transplantation unnecessary. Nevertheless, the preliminary results from this current study should be taken into consideration in the design of future clinical trials regarding this important health problem.

CONCLUSIONS

In conclusion, transplantation of ASCs in this model of CCl₄-induced acute liver failure resulted in a lower

mortality rate in treated animals. ASCs injected in the tail vein were found in the liver in animals in which liver failure had previously been induced. The difference in stem cell count in rats with acute liver failure compared to that in rats with healthy livers was significant at all the time points studied. From the positive results achieved in this study, it is suggested that further research is warranted in the use of stem cell therapy in the treatment of acute liver failure cases.

ABBREVIATIONS

MSCs	Mesenchymal stem cells
ASCs	Adipose derived stem cells
CCL ₄	Carbon tetrachloride
AST	Aspartate aminotransferase
ALT	Alanine aminotransferase

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Rosario Madero, Head of the Biostatistics Unit of La Paz University Hospital for her help with the design and statistical analysis for this study. We would also like to thank Mr. David Bruhn for his assistance in correcting the manuscript to a more readable form.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

This study was supported by a Fundación Mutua Madrileña grant.

REFERENCES

- [1] Burra P, Arcidiacono D, Bizzaro D, Chioato T, et al. Systemic administration of a novel human umbilical cord mesenchymal stem cells population accelerates the resolution of acute liver injury. *BMC Gastroenterol.* 2012;12:88.
- [2] Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, et al. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24:70–77.
- [3] Viswanathan P, Gupta S. New directions for cell-based therapies in acute liver failure. *J Hepatol.* 2012;57:913–915.
- [4] Loukopoulos I, Sfiniadakis I, Pillai A, et al. Mycophenolate mofetil and sirolimus in hepatocyte transplantation in an experimental model of toxic acute liver failure. *J Invest Surg.* 2014;27:205–213.
- [5] Herrera MB, Fonsato V, Bruno S, et al. Human liver stem cells improve liver injury in a model of fulminant liver failure. *Hepatology* 2013;57:311–319.
- [6] Pietrosi G, Vizzini GB, Gruttadauria S, et al. Clinical applications of hepatocyte transplantation. *World J Gastroenterol.* 2009;15:2074–2077.
- [7] Palmes D, Qayumi AK, Spiegel HU. Liver bridging techniques in the treatment of acute liver failure. *J Invest Surg.* 2000;13:299–311.
- [8] Piryaee A, Valojerdi MR, Shahsavani M, et al. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells on nanofibers and their transplantation into a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model. *Stem Cell Rev.* 2011;7:103–118.
- [9] Gruttadauria S, Grosso G, Pagano D, et al. Marrow-derived mesenchymal stem cells restore biochemical markers of acute liver injury in experimental model. *Transplant Proc.* 2013;45:480–486.
- [10] Liu ZC, Chang TM. Intrasplenic transplantation of bioencapsulated mesenchymal stem cells improves the recovery rates of 90% partial hepatectomized rats. *Stem Cells Int.* 2012. doi: 10.1155/2012/697094.
- [11] Alemán CL, Más RM, Rodeiro I, et al. Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months. *Lab Anim.* 1998;32:457–466.
- [12] Wahi PN, Tandon HD, Bharadwaj TP. Acute carbon tetrachloride hepatic injury; composite histological, histochemical and biochemical study. I. Histological and histochemical studies. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1955;37:305–314.
- [13] Yun JW, Kim CW, Bae IH, et al. Determination of the key innate genes related to individual variation in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity using a pre-biopsy procedure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009;239:55–63.
- [14] Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros MD, et al. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum.* 2005;48:1416–1423.
- [15] Pascual I, de Miguel GF, Gómez-Pinedo UA, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells in biosutures do not improve healing of experimental colonic anastomoses. *Br J Surg.* 2008;95:1180–1184.
- [16] Pascual I, Fernández de Miguel G, García Arranz M, et al. Biosutures improve healing of experimental weak colonic anastomoses. *Int J Colorectal Dis.* 2010;25:1447–1451.
- [17] Pareja E, Cortés M, Martínez A, et al. Hepatic cell transplantation: a new therapy in liver diseases. *Cir Esp.* 2010;88:3–11.
- [18] Pareja E, Martínez A, Cortés M, et al. Hepatic cell transplantation. Technical and methodological aspects. *Cir Esp.* 2010;87:139–147.
- [19] Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, et al. IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells.* 2008;26:2705–2712.
- [20] Kim SJ, Park KC, Lee JU, et al. Therapeutic potential of adipose tissue-derived stem cells for liver failure according to the transplantation routes. *J Korean Surg Soc.* 2011;81(3):176–186.
- [21] Mark AL, Sun Z, Warren DS, et al. Stem cell mobilization is life saving in an animal model of acute liver failure. *Ann Surg.* 2010;252(4):591–596.
- [22] Duncan AW, Dorrell C, Grompe M. Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology.* 2009;137(2):466–481.
- [23] Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci.* 1991;36:770–774.
- [24] Weil BR, Manukyan MC, Herrmann JL, et al. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: implications for surgical disease. *J Surg Res.* 2011;167(1):78–86.
- [25] Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res.* 2012;35(2):213–221.
- [26] Georgiev-Hristov T, García-Arranz M, García-Gómez I, et al. Sutures enriched with adipose-derived stem cells decrease the local acute inflammation after tracheal

126 Isabel Pascual-Miguelañez *et al.*

- anastomosis in a murine model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2012;42(3):40–47.
- [27] Trebol Lopez J, Georgiev Hristov T, et al. Stem cell therapy for digestive tract diseases: current state and future perspectives. *Stem Cells Dev.* 2011;20:1113–1129.
- [28] Gonzalez Rey E, Anderson P, Gonzalez MA, et al. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut.* 2009;58:929–939.
- [29] Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol.* 2002;30(8):870–878.

ANEXO 2 Permiso de reproducción de Baxter International Inc.



Secured Message

From: Molina Arevalo, Jose <jose_molina@baxter.com>
To: "javier.medicina@gmail.com" <javier.medicina@gmail.com>
Date: 29 de septiembre de 2015 11:56:13
Subject: FW: Foto MARS con prismaflex-
Attachments: [MARS Prismaflex.png](#)

Estimado Dr. Salinas,

Le adjunto la foto del monitor MARS en combinación con el monitor Prismaflex. Espero que le sirva.

Un saludo,

Jose Molina

Marketing y Ventas de Terapias Avanzadas, División de Acute | Baxter-Gambro
jose_molina@baxter.com | (m) +34 600502569

Gambro Acute Care is the global leader in the delivery of multi-organ, extracorporeal support therapies. For more information as to how Gambro's acute care systems and advanced filtration products may benefit critically ill patients, please contact a Gambro representative or visit us at www.gambro.com.


Baxter International Inc. has completed the acquisition of Gambro AB (including all direct and indirect subsidiaries of Gambro AB).

From: Domenech Barcons, Maria Angels
Sent: martes, 29 de septiembre de 2015 11:36
To: Molina Arevalo, Jose
Subject: Foto MARS con prismaflex

Hola Jose,
Adjunto la foto que comentamos ayer...


MA

ANEXO 3 Licencia de reproducción Creative Commons



Attribution-ShareAlike 3.0 Unported (CC BY-SA 3.0)

This is a human-readable summary of (and not a substitute for) the license.



[Disclaimer](#)


You are free to:

Share — copy and redistribute the material in any medium or format


Adapt — remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

The licensor cannot revoke these freedoms as long as you follow the license terms.

Under the following terms:



Attribution — You must give **appropriate credit**, provide a link to the license, and **indicate if changes were made**. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use.



ShareAlike — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the **same license** as the original.

No additional restrictions — You may not apply legal terms or **technological measures** that legally restrict others from doing anything the license permits.

Notices:

You do not have to comply with the license for elements of the material in the public domain or where your use is permitted by an applicable **exception or limitation**.

No warranties are given. The license may not give you all of the permissions necessary for your intended use. For example, other rights such as **publicity, privacy, or moral rights** may limit how you use the material.

ANEXO 4 Declaración del medicamento “células humanas inmortalizadas derivadas de hepatoblastoma C3A” como medicamento huérfano.



COMISIÓN EUROPEA

Bruselas, 19.6.2013
C(2013)3964 (final)

DECISIÓN DE EJECUCIÓN DE LA COMISIÓN

de 19.6.2013

relativa a la declaración del medicamento "Células humanas inmortalizadas de hepatoblastoma C3A" como medicamento huérfano con arreglo al Reglamento (CE) n° 141/2000 del Parlamento Europeo y del Consejo

(Texto pertinente a efectos delEEE)

(EL TEXTO EN LENGUA INGLESA ES EL ÚNICO AUTÉNTICO)

DECISIÓN DE EJECUCIÓN DE LA COMISIÓN

de 19.6.2013

relativa a la declaración del medicamento "Células humanas inmortalizadas de hepatoblastoma C3A" como medicamento huérfano con arreglo al Reglamento (CE) n° 141/2000 del Parlamento Europeo y del Consejo

(Texto pertinente a efectos del EEE)

(EL TEXTO EN LENGUA INGLESA ES EL ÚNICO AUTÉNTICO)

LA COMISIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea,

Visto el Reglamento (CE) n° 141/2000 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 1999, sobre medicamentos huérfanos¹, y, en particular, la primera frase del apartado 8 de su artículo 5,

Vista la solicitud presentada el 28 de febrero de 2013 por Vital Therapies Limited de conformidad con el apartado 1 del artículo 5 del Reglamento (CE) n° 141/2000.

Visto el dictamen positivo de la Agencia Europea de Medicamentos, formulado el 21 de mayo de 2013 por el Comité de medicamentos huérfanos y recibido por la Comisión el 21 de mayo de 2013

Considerando lo siguiente:

- (1) La solicitud presentada por Vital Therapies Limited relativa al medicamento "Células humanas inmortalizadas de hepatoblastoma C3A" fue validada el 15 de marzo de 2013 de conformidad con lo dispuesto en el apartado 4 del artículo 5 del Reglamento (CE) n° 141/2000.
- (2) El medicamento "Células humanas inmortalizadas de hepatoblastoma C3A" cumple los criterios de declaración establecidos en el apartado 1 del artículo 3 del citado Reglamento.
- (3) Procede pues dar curso a la solicitud.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DECISIÓN:

Artículo 1

El medicamento "Células humanas inmortalizadas de hepatoblastoma C3A" queda declarado como medicamento huérfano para la siguiente indicación: Tratamiento de la insuficiencia hepática aguda. Dicho medicamento está inscrito en el registro comunitario de medicamentos huérfanos con el número EU/3/13/1143.

¹ DO L 18 de 22.1.2000, p. 1.

Artículo 2

La Agencia Europea de Medicamentos pondrá a disposición de todas las partes interesadas el dictamen del Comité de medicamentos huérfanos a que hace referencia la presente Decisión.

Artículo 3









El destinatario de la presente Decisión será Vital Therapies Limited, The Clockhouse, Station Approach, Marlow, Bucks SL7 1NT, United Kingdom.

Hecho en Bruselas, el 19.6.2013.

Por la Comisión
Paola TESTORI COGGI
Director General

ANEXO 5 Fichas Internacionales de Seguridad Química, CCl₄

Fichas Internacionales de Seguridad Química

TETRACLORURO DE CARBONO		ICSC: 0024	
		Abril 2000	
Tetraclorometano		Tetraclorocarbono	
CAS:	56-23-5	CCl ₄	 
RTECS:	FG4900000	Masa molecular: 153.8	
NU:	1846		
CE Índice Anexo I:	602-008-00-5		
CE / EINECS:	200-262-8		
TIPO DE PELIGRO / EXPOSICIÓN	PELIGROS AGUDOS / SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS / LUCHA CONTRA INCENDIOS
INCENDIO	No combustible. En caso de incendio se desprenden humos (o gases) tóxicos e irritantes.		En caso de incendio en el entorno: usar medio de extinción adecuado.
EXPLOSIÓN			En caso de incendio: mantener fríos los bidones y demás instalaciones rociando con agua.
EXPOSICIÓN		¡EVITAR TODO CONTACTO!	
Inhalación	Vértigo. Somnolencia. Dolor de cabeza. Náuseas. Vómitos.	Ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo. Respiración artificial si estuviera indicada. Proporcionar asistencia médica.
Piel	¡PUEDA ABSORBERSE! Enrojecimiento. Dolor.	Guantes de protección. Traje de protección.	Quitar las ropas contaminadas. Aclarar la piel con agua abundante o ducharse. Proporcionar asistencia médica.
Ojos	Enrojecimiento. Dolor.	Pantalla facial o protección ocular combinada con la protección respiratoria.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad), después proporcionar asistencia médica.
Ingestión	Dolor abdominal. Diarrea. (Para mayor información, véase Inhalación).	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo. Lavarse las manos antes de comer.	Enjuagar la boca. Dar a beber uno o dos vasos de agua. Proporcionar asistencia médica.
DERRAMES Y FUGAS		ENVASADO Y ETIQUETADO	
<p>Recoger el líquido procedente de la fuga en recipientes tapados. Absorber el líquido residual en arena o absorbente inerte y trasladarlo a un lugar seguro. NO permitir que este producto químico se incorpore al ambiente. (Protección personal adicional: traje de protección completa incluyendo equipo autónomo de respiración).</p>		<p>Envase irrompible; colocar el envase frágil dentro de un recipiente irrompible cerrado. No transportar con alimentos y piensos. Contaminante marino.</p> <p>Clasificación UE Símbolo: T, N R: 23/24/25-40-48/23-52/53-59 S: (1/2-)23-36/37-45-59-61</p> <p>Clasificación NU Clasificación de Peligros NU: 6.1 Grupo de Envasado NU: II</p>	
RESPUESTA DE EMERGENCIA		ALMACENAMIENTO	
<p>Ficha de emergencia de transporte (Transport Emergency Card): TEC (R)-61S1846; Código NFPA: H 3; F 0; R 0;</p>		<p>Separado de metales, alimentos y piensos, Véanse Peligros Químicos. Ventilación a ras del suelo. Mantener en lugar fresco.</p>	
<div> <div> IPCS International Programme on Chemical Safety </div> <div>  WHO </div> <div>  </div> <div>  UNEP </div> <div>  </div> <div>  MINISTERIO DE TRABAJO E INMIGRACIÓN </div> <div>  INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO </div> </div> <p>Preparada en el Contexto de Cooperación entre el IPCS y la Comisión Europea © IPCS, CE 2005</p>			

VÉASE INFORMACIÓN IMPORTANTE AL DORSO

Fichas Internacionales de Seguridad Química

TETRACLORURO DE CARBONO		ICSC: 0024
DATOS IMPORTANTES		
ESTADO FÍSICO; ASPECTO: Líquido incoloro, de olor característico.		VÍAS DE EXPOSICIÓN: La sustancia se puede absorber por inhalación a través de la piel y por ingestión.
PELIGROS FÍSICOS: El vapor es más denso que el aire		RIESGO DE INHALACIÓN: Por evaporación de esta sustancia a 20 °C se puede alcanzar muy rápidamente una concentración nociva en el aire.
PELIGROS QUÍMICOS: En contacto con superficies calientes o con llamas esta sustancia se descompone formando humos tóxicos y corrosivos (cloruro de hidrógeno ICSC0163, vapores de cloro ICSC0126 y fosgeno ICSC0007). Reacciona con algunos metales como aluminio, magnesio, zinc, originando peligro de incendio y explosión.		EFFECTOS DE EXPOSICIÓN DE CORTA DURACIÓN: La sustancia irrita los ojos. La sustancia puede causar efectos en hígado, riñón y sistema nervioso central, dando lugar a pérdida del conocimiento. Se recomienda vigilancia médica.
LÍMITES DE EXPOSICIÓN: TLV (como STEL): 10 ppm; TLV (como TWA): 5 ppm; A2 (piel) (ACGIH 2004). MAK: 0.5 ppm; 3.2 mg/m ³ ; H. Cancerígeno clase: 4, Categoría de limitación de pico: II(2), Riesgo para el embarazo: grupo C (DFG 2006)		EFFECTOS DE EXPOSICIÓN PROLONGADA O REPETIDA: El contacto prolongado o repetido con la piel puede producir dermatitis. Esta sustancia es posiblemente carcinógena para los seres humanos.
PROPIEDADES FÍSICAS		
Punto de ebullición: 76.5 °C Punto de fusión: -23 °C Densidad relativa (agua = 1): 1.59 Solubilidad en agua, g/100 ml a 20 °C: 0.1 (muy escasa) Presión de vapor, kPa a 20 °C: 12.2 Densidad relativa de vapor (aire = 1): 5.3		Densidad relativa de la mezcla vapor/aire a 20 °C (aire = 1): 1.5 Coeficiente de reparto octanol/agua como log Pow: 2.64
DATOS AMBIENTALES		
La sustancia es nociva para los organismos acuáticos. Esta sustancia puede ser peligrosa para el ambiente; debería prestarse atención especial a la capa de ozono.		
NOTAS		
El consumo de bebidas alcohólicas aumenta el efecto nocivo. Está indicado examen médico periódico dependiendo del grado de exposición. La alerta por el olor es insuficiente. NO utilizar cerca de un fuego, una superficie caliente o mientras se trabaja en soldadura. Esta ficha ha sido parcialmente actualizada en octubre de 2006: ver Límites de exposición e Ingestión-Primeros auxilios		
INFORMACIÓN ADICIONAL		
Límites de exposición profesional (INSHT 2011): VLA-ED: 5 ppm; 32 mg/m ³ VLA-EC: 10 ppm, 64 mg/m ³ Notas: vía dérmica. Esta sustancia tiene establecidas restricciones a la producción, importación, exportación, puesta en el mercado, uso, recuperación, reciclado, regeneración y eliminación especificadas en el Reglamento (CE) N° 2037/2000 sobre las sustancias que agotan la capa de ozono.		
Nota legal		Esta ficha contiene la opinión colectiva del Comité Internacional de Expertos del IPCS y es independiente de requisitos legales. Su posible uso no es responsabilidad de la CE, el IPCS, sus representantes o el INSHT, autor de la versión española.
© IPCS, CE 2005		

ANEXO 6 Estudios epidemiológicos de la OMS de carcinogénesis por CCl₄

Epidemiological results from industry-based studies relevant to the evaluation of carbon tetrachloride							
Reference	Country	Cohort size/ no. of deaths	Cancer site ^a	Observed	RR	95% CI	Comment
Ott <i>et al.</i> (1985)	United States	226/42	All cancers	9	0.7	0.3–1.3	Expected from US rates
					[0.8]	[0.4–1.5]	Expected from company rates
			Respiratory	3	[0.7]	[0.1–2.0]	
			Digestive	6	[1.8]	[0.7–4.0]	
Blair <i>et al.</i> (1990)	United States	5365/1129	Pancreas	3	[3.3]	[0.7–9.7]	
			All cancers	294	[1.2]	1.0–1.3	
			Lung	47	1.3	0.9–1.7	
			Oesophagus	13	2.1	1.1–3.6	
			Pancreas	15	1.2	0.7–1.9	
			Lympho/reticulosarcoma	7	1.7	0.7–3.4	
			Hodgkin's disease	4	2.1	0.6–5.3	
			Leukaemia	7	0.9	0.4–1.8	
			Other lymphatic	4	0.7	0.2–1.8	
			Breast	36	1.0	0.7–1.4	
Blair <i>et al.</i> (1998)	United States	14475/3832	All cancers ^b	641	0.90	0.83–0.97	SMR, full cohort Incident cancer, RR from Poisson regression
			Non-Hodgkin lymphoma, women	8 exposed	3.3	0.9–12.7	
			Non-Hodgkin lymphoma, men	14 exposed	1.2	0.4–3.3	
			Multiple myeloma, women	4 exposed	2.0	0.4–9.1	
			Multiple myeloma, men	10 exposed	1.2	0.4–3.7	
Wilcosky <i>et al.</i> (1984)	United States	6678	Breast, women	18 exposed	1.3	0.7–2.5	Odds ratios from nested case–control analysis
			Lymphocytic leukaemia (white men)	8 exposed	15.3	<i>p</i> < 0.0001	
Bond <i>et al.</i> (1986)	United States	19608	Lymphosarcoma (white men)	6 exposed	4.2	<i>p</i> < 0.05	Odds ratio from nested case–control analysis
			Lung cancer		0.8	0.6–1.1	

^a Results are presented for all cancers, lung, oesophagus, pancreas, lymphatic and haematopoietic cancers, and breast when reported.

^b Includes entire cohort regardless of potential exposure to dichloromethane.

ANEXO 7

Protocolo de tinción con PKH26

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA

Tel: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-5052 (314) 771-5757

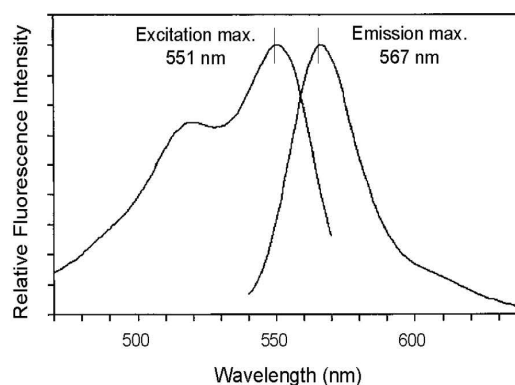
email: techservice@sial.com sigma-aldrich.com

Product Information

**PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kits
for General Cell Membrane Labeling**Catalog Numbers **MINI26** and **PKH26GL**
Store at Room Temperature**TECHNICAL BULLETIN****Product Description**

The PKH26 Fluorescent Cell Linker Kits use proprietary membrane labeling technology to stably incorporate a yellow-orange fluorescent dye with long aliphatic tails (PKH26) into lipid regions of the cell membrane.^{1,2} The labeling vehicle provided in the kits (Diluent C) is an aqueous solution designed to maintain cell viability, while maximizing dye solubility and staining efficiency during the labeling step.³ Diluent C is iso-osmotic for mammalian cells and contains no detergents or organic solvents, but also lacks physiologic salts and buffers.¹ The appearance of labeled cells may vary from bright and uniform to punctate or patchy, depending on the cell type being labeled and the extent to which membrane internalization occurs after labeling.²⁻⁵ However, PKH26 fluorescence is independent of pH within physiologic ranges and fluorescence intensity per cell is typically unaffected by the pattern of dye localization.^{1,4,5}

PKH26 fluoresces in the yellow-orange region of the spectrum (Figure 1) and has been found to be useful for *in vitro* and *in vivo* cell tracking applications in a wide variety of systems. PKH26 is compatible with violet, green, red or far-red viability probes used in cytotoxicity assays^{3,6-10} and with fluorescent proteins, antibodies or DNA dyes emitting in these spectral regions. One of the most common uses of PKH26 is proliferation analysis based on dye dilution¹¹⁻²⁰. Applications of dye dilution proliferation analysis include estimation of antigen-specific precursor frequencies^{1,9,14,15} and identification of quiescent or slowly dividing stem or progenitor cells in normal^{16,17} and neoplastic tissues.¹⁶⁻²⁰ PKH26 has also proven useful for monitoring: uptake of exosomes,²¹ platelets²² or nanoparticles;²³ cell-cell membrane transfer,²⁴⁻²⁸ phagocytosis,^{28,29} antigen presentation,^{26,27,30} adhesion,³¹ signaling through gap junctions,³² and neuronal migration in tissue slices.³³ Due to its extremely stable fluorescence,³ PKH26 is the cell linker dye of choice for *in vivo* cell tracking studies,^{4,18-20,23,33-45} particularly when labeled cells are to be followed for periods longer than a few weeks.^{4,20,38-41}

Figure 1. PKH26 Excitation and Emission Spectra**Components**

	PKH26 Dye* (P9691)	Diluent C (G8278)
MINI26	1 × 0.1 mL	1 × 10 mL
PKH26GL	1 × 0.5 mL	6 × 10 mL

* 1 × 10⁻³ M in ethanol

The MINI26 kit is recommended for small or preliminary studies, and the PKH26GL kit for *in vivo* studies.

Equipment and Reagents Required but Not Provided for General Membrane Labeling

- Uniform suspension of well-dispersed single cells in tissue culture medium
- Tissue culture medium with serum (complete medium)
- Ca²⁺, Mg²⁺, and serum free medium or buffered salt solution (e.g., Dulbecco's PBS or Hank's BSS)
- Serum, albumin, or other system-compatible protein
- Polypropylene conical bottom centrifuge tubes (4–15 mL)
- Temperature-controlled centrifuge (up to 1,000 × g)
- Instrument(s) for fluorescence analysis (fluorescence plate reader, fluorescence or confocal microscope, flow cytometer)
- Laminar flow hood
- Hemocytometer or cell counter
- Slides and coverslips

Precautions and Disclaimer

These products are for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Storage/Stability

The PKH26 ethanolic dye solution (Catalog Number P9691) may be stored at room temperature or refrigerated. To prevent increases in dye concentration due to evaporation, **keep the ethanolic dye solution tightly capped** except when in immediate use. The dye solution must be protected from bright direct light and examined for crystals prior to use. If crystals are noted in the dye solution, warm slightly in a 37°C water bath, and sonicate or vortex until redissolved.

Diluent C may be stored at room temperature or refrigerated. If refrigerated, bring to room temperature before preparing cell and dye suspensions for labeling (Procedures, steps A5 and A6). Diluent C is provided as a sterile solution. Because it does not contain any preservatives or antibiotics, it should be kept sterile. **Do not store dye in Diluent C.** Working solutions of dye in Diluent C should be made **immediately** prior to use.

Procedures**A. General Cell Membrane Labeling.**^{1-4,9}

Labeling occurs by partitioning of the lipophilic dye into cell membranes. Labeling intensity is a function of both dye concentration and cell concentration and is not saturable. Therefore, it is essential that the amount of dye available for incorporation be limited. Over-labeling of cells will result in loss of membrane integrity and reduced cell recovery.

The following labeling procedure can be used for *in vitro* or *ex vivo* labeling of stem cells, lymphocytes, monocytes, endothelial cells, neurons or any other cell type where partitioning of dye into lipid regions of the cell membrane is desired.^{1-4,2} Modified procedures may be required for *in vivo* labeling,^{4,3} for labeling platelets,² or for selective labeling of phagocytes in the presence of non-phagocytes.^{2,3,44,45}

General cell membrane labeling should be performed prior to monoclonal antibody staining. The membrane dyes will remain stable during the monoclonal staining at 4 °C; however, capping of the monoclonal antibodies is highly probable if the general cell membrane labeling is carried out at ambient temperature subsequent to antibody labeling.

The cell and dye concentrations given in the following procedure represent starting concentrations that have been found broadly applicable to a variety of cell types.⁷ **Users must determine the optimal dye and cell concentrations for their cell type(s) and experimental purposes** by evaluating post-staining cell viability (e.g., propidium iodide exclusion), fluorescence intensity, staining homogeneity, and lack of effect on cell function(s) of interest.^{1,9,42}

Note 1: No azide or metabolic poisons should be present at the time of staining with PKH26.

Note 2: Although adherent cells may be labeled while

attached to a substrate, more homogeneous staining is obtained using single cell suspensions. Best results will be obtained if adherent or bound cells are dispersed into a single cell suspension using proteolytic enzymes, e.g., trypsin/EDTA, prior to staining.

The following procedure uses a 2 mL final staining volume containing final concentrations of 2×10^{-6} M of PKH26 and 1×10^7 cells/mL.

Perform all further steps at ambient temperature (20–25 °C)

1. Place a suspension containing 2×10^7 single cells in a conical bottom polypropylene tube and wash once using medium without serum.

Note: Serum proteins and lipids also bind the dye, reducing the effective concentration available for membrane labeling. Best results are obtained by washing once with serum-free medium or buffer (step 1) prior to resuspension in Diluent C for labeling (step 4).

2. Centrifuge the cells (400 × g) for 5 minutes into a loose pellet.

Note: The PKH26 ethanolic dye solution should not be added directly to the cell pellet. This will result in heterogeneous staining and reduced cell viability.

3. After centrifuging cells, carefully aspirate the supernatant, being careful not to remove any cells but leaving no more than 25 µL of supernatant.

Note: For reproducible results, it is important to minimize the amount of residual medium or buffer present when cells are resuspended in Diluent C. See Note 28 in Ref. 9 for suggested methods.

4. Prepare a 2x Cell Suspension by adding 1 mL of Diluent C (Catalog Number G8278) to the cell pellet and resuspend with gentle pipetting to insure complete dispersion. **Do not vortex and do not let cells stand in Diluent C for long periods of time.**

Note: The presence of physiologic salts causes the dye to form micelles and substantially reduces staining efficiency. Therefore, it is important that the cells be suspended in Diluent C at the time dye is added, not in medium or buffered salt solutions.

5. **Immediately prior to staining,** prepare a 2x Dye Solution (4×10^{-6} M) in Diluent C by adding 4 µL of the PKH26 ethanolic dye solution (Catalog Number P9691) to 1 mL of Diluent C in a polypropylene centrifuge tube and mix well to disperse.

Note 1: To minimize ethanol effects on cell viability, the volume of dye added in step 5 should result in no more than 1–2% ethanol at the end of step 6.

Note 2: If a final dye concentration $< 2 \times 10^{-6}$ M is desired, the most reproducible results will be obtained by diluting the PKH26 ethanolic dye solution provided in the kit with

B. Histology

PKH26 labeled adipocytes have been successfully identified in tissues subjected to standard paraffin embedding and sectioning,³⁸ but such methods risk loss of intensity because they use clearing agents that may partially extract membrane lipids and lipophilic dyes.^{1,3,4}

Histologic studies of tissues containing cells labeled with lipophilic membrane dyes have typically been carried out on serial frozen sections⁴² or sections prepared after fixation in neutral buffered formalin prepared from 4% paraformaldehyde.^{37,40,41} These methods avoid quenching of fluorescence by absorbing dyes found in histologic counterstains. For studies where imaging is to be done on a single section, fluorescence microscopy should precede counterstaining.⁴²

The following methods were developed at the Pittsburgh Cancer Institute by Drs. Per Basse and Ronald H. Goldfarb for use with PKH26.

Fluorescence imaging of frozen sections:

1. Excise tissues to be sectioned and freeze immediately on dry ice.
2. Store tissues at -70°C prior to sectioning.
3. Mount frozen tissues using O.C.T. compound (Tissue-Tek; Miles, Inc.) or equivalent.
4. Prepare tissue sections.
5. Air dry slides for at least 1 hour at room temperature.
6. Mount coverslip using 1–2 drops of cyanoacrylate ester glue. (Successful results have been obtained using the following brands of cyanoacrylate ester glue: Elmer's Wonder Bond, Archer Instant Bonding Adhesive, Bondo Super Glue, Duro Super Glue, Scotch Instant Glue and Instant Krazy Glue).
7. Examine or photograph sections using an appropriate filter setup (e.g., PE for PKH26).

Counterstaining of frozen sections:

1. Remove coverslips by soaking slides in acetone for 24–48 hours.
2. Rinse slides in distilled water to remove acetone.
3. Counterstain sections using stain of choice. Satisfactory results have been obtained using Mayer's or Harris hematoxylin.
4. Mount slides using AS/AP permanent aqueous mounting medium (Bio/Can America, Inc., Portland, ME) or equivalent.

References

1. Wallace, P.K. et al., *Cytometry* **73A**, 1019-1034 (2008).
2. Horan, P.K. et al., *Meth. Cell Biol.*, **33**, 469-490 (1990).
3. Poon, R.Y. et al., in: *In Living Color: Flow Cytometry and Cell Sorting Protocols*, Diamond, R. A., and DeMaggio, S., (eds.), Springer-Verlag, (New York, NY: 2000) p.302-352.
4. Wallace, P.K. and Muirhead, K.A., *Immunol. Invest.*, **36**, 527-562 (2007).
5. Rousselle, C. et al., *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, **37**, 646-655 (2001).
6. Parmigiani, A. et al., *Human Immunol.*, **72**, 115-123 (2011).
7. Xiao, P. et al., *J. Virology*, **84**, 7161-7173 (2010).
8. Awan, F.T. et al., *Blood*, **115**, 1204-1213 (2010).
9. Tario, J.D. Jr. et al., *Meth. Mol. Biol.*, **699**, 119-164 (2010).
10. Zaritskaya, L. et al., *Expert Rev. Vaccines*, **9**, 601-616 (2010).
11. Brusko, T. et al., *Immunol Invest.*, **36**, 607-628 (2007).
12. Arikawa, T. et al., *Eur. J. Immunol.*, **40**, 548-558 (2010).
13. Morse, M.D., McNeel, D.G., *Human Immunol.*, **71**, 496-504 (2010).
14. Bantly, A.D., et al., *Immunol. Invest.*, **36**, 587-606 (2007).
15. Schwaab, T. et al., *Immunol Invest.*, **36**, 649-664 (2007).
16. Cicalese, A., et al., *Cell* **138**, 1083-1095 (2009).
17. Pece, S., et al., *Cell* **140**: 62-73 (2010).
18. Kusumbe, A.P., Bapat, S., *Cancer Res.*, **69**, 9245-9253 (2010).
19. Schubert M., et al., *Exp. Hematol.*, **39**, 250-263.e4 (2011)
20. Hermann, I., et al., *PLoSOne*, **5**, e13474 (2010).
21. Medina, A. et al., *Wound Repair Regen.*, **18**, 245-253 (2010).
22. Catani, L., et al., *Exp. Hematol.*, doi:10.1016/j.exphem.2010.12.011 (2011)
23. Kateb, B. et al., *Meth. Mol. Biol.*, **651**, 307-317 (2010).
24. Daubeuf, S. et al., *Immunol. Invest.*, **36**, 687-712 (2007).
25. Allegre, E. et al., *Cell Research*, **20**: 1239-1251 (2010)
26. HoWangYin, K-Y. et al., *Cell. Mol. Life Sci.*, **67**, 1133-1145 (2010).
27. Jambou, R. et al., *PLoS Pathogens*, **6**, e1001021 (2010).
28. Belyaev, N.N. et al., *Nature immunol.*, **11**, 477-485 (2010).
29. Eshel, R., et al., *J. Cancer Ther.*, **1**, 142-151 (2010).
30. Esmann, L., et al., *J. Immunol.*, **184**, 391-400 (2010).
31. Heroult, M., et al., *Mol. Cancer Res.*, **8**, 1297-1309 (2010).
32. Behrens, J., et al., *Eur. J. Cell Biol.*, **89**, 828-838 (2010).
33. Kaneko, N. et al., *Neuron*, **67**, 213-223 (2010).
34. Askenasy, N. et al., *Immunol Invest.*, **36**, 713-738 (2007).
35. Juopperi, T.A., Sharkis, S.J., *Meth. Mol. Biol.* **430**, 21-30 (2008)
36. Ledgerwood, L.G., *Nature Immunol.*, **9**, 42-53 (2008).
37. Morigi, M. et al., *Stem Cells*, **28**, 513-522 (2010).
38. Rieck, B., *Cell Biol. Inter.*, **27**, 445-447 (2003).
39. Bolton, D.L. et al., *J. Immunol.*, **184**, 303-314 (2010).
40. Kajbafzadeh, A., et al., *Dis. Colon Rectum*, **53**: 1415-1421 (2010).
41. Osanai, T. et al., *Neurosurgery*, **66**, 1140-1147 (2010).
42. Wallace, P.K. et al., *Cancer Res.*, **53**, 2358-2367 (1993).
43. Lehner, T. et al., *Eur. J. Immunol.*, **30**, 2245-2256 (2000).
44. Maus, U. et al., *Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **280**, L58-L68 (2001).
45. Albertine, K.H., and Gee, M.H.J., *J. Leuk. Biol.*, **59**, 631-638 (1996).

U.S. Patent #5,665,328
Distributed for Phanos Technologies

FF;PHC 03/11-1

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.

Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply.

Please see reverse side of the invoice or packing slip.

El protocolo que usamos en el laboratorio presenta modificaciones menores respecto al que recomienda el fabricante:

1. Se levantan las células con Tripsina/EDTA.
2. Se resuspenden en 20 mL de DMEM sin suero. Se utiliza DMEM sin suero, ya que las proteínas y las sales minerales tienen afinidad por el PKH26 y reducen la eficiencia del marcaje.
3. Se centrifugan 5 minutos a 400g.
4. Se resuspende el pellet celular en 500 ml de Solución C, dispersando muy bien la solución celular para maximizar la eficiencia del marcaje posterior.
5. Justo antes del marcaje, preparar la Solución de Trabajo 2X, mezclando 500 ml de Solución C y 2 ml de PKH26.
6. Añadir los 500 ml de solución celular a los 500 ml de Solución de Trabajo y mezclar bien, pipeteando.
7. Incubar a temperatura ambiente de 2 a 5 min., pipeteando periódicamente y en oscuridad.
8. Detener la reacción con 2 ml de FBS e incubar 2 min para disminuir el posible exceso de PKH26.
9. Añadir 10 ml de DMEM completo para lavar las células.
10. Centrifugar 10 min a 400g.
11. Repetir el lavado con DMEM dos veces más.
12. Resuspender las células en salino para inyectarlas en las ratas.

ANEXO 8

Protocolo de tinción con DAPI



VECTASHIELD® MOUNTING MEDIUM with DAPI

Catalog Number H-1200

Description: VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI is a glycerol-based mounting medium for preserving fluorescence containing the DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) counterstain.

Unit Size: 10 ml

Concentration of DAPI: 1.5 µg/ml

Storage Conditions: Store bottle in an upright position at 2 - 8 °C in the dark.

INSTRUCTIONS FOR USE

To mount tissues or cells on a slide, dispense one drop of VECTASHIELD® Mounting Medium onto the section. Then coverslip and allow VECTASHIELD® Mounting Medium to disperse over the entire section. Applying an excess of mounting medium is not recommended. The special pipet supplied with the product is designed to deliver small drop volumes of approximately 25 µl. The Refractive Index is 1.44.

VECTASHIELD® Mounting Medium does not solidify, but remains a liquid on the slide. After mounting, coverslipped slides will not readily dry out and can be reviewed for weeks afterward without sealing. For prolonged storage coverslips can be permanently sealed around the perimeter with nail polish or a plastic sealant. Mounted slides should be stored at 2 - 8 °C protected from light.

DAPI excites at about 360 nm and emits at about 460 nm when bound to DNA, producing a blue fluorescence. DAPI may also stain RNA.

DISPOSAL OF REAGENTS

Flush to sewer if allowed or dispose of reagents according to local regulations.

MSDS available online at: www.vectorlabs.com

For Professional Use Only.

Authorized Representative / Exclusive Distributor to UK & Ireland:
Vector Laboratories Ltd
3 Accent Park
Bakewell Road, Orton Southgate
Peterborough, PE2 6XS, United Kingdom
Tel: (01733) 237999 • Fax: (01733) 237119

Revised 12/09

Vector Laboratories, Inc., 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010 U.S.A.
Tel: (650)697-3600 • Fax (650)697-0339 • Email: vector@vectorlabs.com • Website: www.vectorlabs.com

